

INSTITUTUL DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
I A Ș I

CATEDRA DE BIOCHIMIE

BIOCHIMIE MEDICALA

LUCRARI PRACTICE

COLECTIVUL DIDACTIC

Asist. BAZGAN L., Asist. Dr. BUSUIOC A., Asist. Dr.
CERNATESCU D., Sef lucr. Dr. DUMBRAVA E., Asist. Dr.
GHEORGHITA N., Asist. IACUBOVICI A., Asist. JERCA L.,
Asist. LEIBA A., Asist. PAVEL M., Conf. Dr. SERBAN F.,
Asist. TERNER C.

1973

INSTITUTUL DE MEDICINA SI FARMACIE IASI
CATEDRA DE BIOCHIMIE

Sef Catedră: Prof. Dr. Doc. ABABEI L.

Jubuschi Z.

BIOCHIMIE MEDICALA

LUCRARI PRACTICE

1973

C U P R I N S

NOTIUNI DE VOLUMETRIE

Exprimarea concentrației soluțiilor	1
Analiza volumetrică	8
Acidimetrie și alcalimetrie	9
Prepararea și titrarea sol. de NaOH 0,1 N	10
Prepararea și titrarea sol. de HCl 0,1 N	11
Prepararea și titrarea sol. de H ₂ SO ₄ 0,1 N	13
Permanganometrie	14
Prepararea și titrarea sol. de KMnO ₄ 0,1 N	14
Iodometrie	15
Prepararea și titrarea sol. de Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 N	15
Prepararea și titrarea sol. de iod 0,1 N	18
Argentometrie	19
Chelatometrie	20
SOLUTII TAMPON	22

PRELUCRAREA MATERIALULUI BIOLOGIC

Recoltarea și prelucrarea la rece	33
Omogenate tisulare	33
Prepararea omogenatelor	38
Standardizarea	39
Hemolizate de sânge	40
Separarea de mitocondrii din ficatul de șobolan	41
Separarea de mitocondrii din creierul de șobolan	42
Prelucrarea țesuturilor pentru dozarea de electroliti	44

ENZIME

Principii de dozare a activității enzimatice în ultraviolet	51
Dozarea LDH în ser	53
Izoenzimele LDH	57
Separarea izoenzimelor LDH pe gel de agar	58
Dozarea activității enzimei LDH ₁	62
Dozarea activității G-6PDH în eritrocite	65
Dozarea activității glutamat dehidrogenazei în plasmă	67
Dozarea activității catalazei din sînge	71
Dozarea activității transaminazei din ser	73
Dozarea activității amilazei în ser și urină (Metoda Wohlgemuth)	78
Dozarea activității amilazei în ser și urină (Metoda colorimetrică)	80
Dozarea activității lipazei pancreatice	83
Dozarea activității tripsinei în sucul pancreatic	84
Dozarea activității uropepsinei	86
Dozarea activității colinesterazei serice	90
Dozarea activității fosfatazei alcaline din ser	92
Dozarea activității fosfatazei alcaline în ser cu 4-amino antipirină	94
Dozarea activității fosfatazei acide din ser	97
Dozarea activității aldolazei din ser	102
GLUCIDE	
Dozarea glucozei în sînge	106
Dozarea glucozei din lichide biologice cu o-toluidină	112

Dozarea glucidelor urinare	114
Dozarea polarimetrică a glucozei în urină	117
Determinarea enzimatică a piruvatului	120
Dozarea colorimetrică a acidului piruvic	123
Dozarea acidului lactic în ser	125
Dozarea mucoproteinelor serice	128
Dozarea semicantitativă a mucoproteinelor urinare	130
Dozarea hexozaminelor în ser	131
Dozarea metilpentozelor în ser	134
LIPIDE	
Dozarea lipidelor totale	137
Dozarea lipidelor totale din ser	138
Dozarea lipidelor totale din ser prin reacția SPV modificată	140
Dozarea colesterolului total în ser	141
Dozarea colesterolului în ser (Metoda Ferro - Huang)	144
Dozarea colesterolului în ser (Metoda Zak - Henly)	145
Dozarea colesterolului în ser (Metoda turbidimetrică)	147
Dozarea colesterolului esterificat	149
Dozarea colesterolului liber și esterificat	150
Dozarea colesterolului din fracțiunea beta-lipoproteică	154
Dozarea beta-lipoproteinelor serice	155
Dozarea trigliceridelor	156
Dozarea trigliceridelor serice	160

Dozarea lecitinei din ser	164
Dozarea lecitinei din ser	167
Testul Gordis simplificat	172
Determinarea corpiilor cetonici	173
PROTIDE	
Dozarea proteinelor din ser, refractometric	175
Dozarea proteinelor din ser prin metoda azotometrică	177
Dozarea proteinelor prin reacția biuretului	181
Dozarea gravimetrică a fibrinogenului	182
Dozarea colorimetrică a fibrinogenului	184
Dozarea ureei în sânge și zrină (Metoda cu urează)	186
Dozarea ureei în sânge și urină (Micrometoda Ambard)	188
Dozarea creatininei în sânge	192
Dozarea creatininei în urină	194
Dozarea acizilor aminați în urină	196
Dozarea amoniacului în plasmă	198
Dozarea acidului uric din ser	202
Dozarea acidului uric din urină	204
Teste de disproteinemie	207
Testul Takata - Ara	209
Testul Gross	211
Testul Kunkel	212
Testul Wunderly - Wuhrman	214
Testul Mc Lagan	215
Testul Weltman cu CaCl_2	217
Testul Gaté	219

Dozarea bilirubinei	220
Cercetarea porfirinelor urinare	223
Dozarea porfirinelor urinare	225
ELECTROLITI	
Dozarea NaCl în sînge	
(Metoda Volhard - Charapantier)	229
Dozarea clorurilor în ser	
(Metoda Schales)	230
Dozarea NaCl în urină	
(Metoda Mohr)	232
Dozarea sodiului în ser	234
Dozarea potasiului în sînge	
(Metoda Kramer - Tisdall)	237
Dozarea calciului în ser	245
Dozarea complexometrică a calciului și magneziului din ser	247
Dozarea complexometrică a calciului și magneziului în urină	249
Dozarea fosforului anorganic în ser	252
Dozarea fosforului în ser	
(Metoda fără deproteinizare)	254
Dozarea fosforului în urină	255
Dozarea sulfului în urină	
(Metoda Gauvin)	259
Dozarea rezervei alcaline	
(Metoda Van Slyke)	262
Dozarea rezervei alcaline	
(Metoda titrimetrică)	265

SUCUL GASTRIC

Dozarea acidității sucului gastric	268
Cercetarea acidului lactic în sucul gastric	270

LICHIDUL CEFALO - RAHIDIAN

Cercetarea hipo- și hiperglicorahiei	274
Cercetarea calitativă a albuminelor	276
Cercetarea globulinelor	277
Dozarea proteinorahiei	278
Dozarea proteinelor totale	279
Proba reducerii permanganatului de potasiu	281

ANALIZA BIOCHIMICA A URINII

Examenul fizic al urinei	282
pH-ul urinei	285
Cercetarea calitativă a proteinelor	287
Determinarea cantitativă a proteinelor	289
Cercetarea glucozei	290
Cercetarea acetonei	291
Cercetarea pigmentilor biliari	292
Cercetarea urobilinogenului	294
Cercetarea urobilinei	295
Acizii și sărurile biliare	296
Cercetarea indicanului	298
Dozarea acidității urinare	299

MATERII FECALE

Examenul microscopic	302
Dozarea acizilor organici și a amoniacului	304

METODE FIZICO - CHIMICE DE ANALIZA	
Metode fizico - chimice de analiză	308
Metode optice de analiză	309
Colorimetria	310
Fotocolorimetria	313
Spectrofotometria	313
Flamfotometria	314
Electroforeza	324
Electroforeza pe hîrtie	324
Dozarea electroforetică a proteinelor din serul sanguin - Proteinograma	328
Dozarea electroforetică a lipoproteinelor din serul sanguin - Lipidograma	331
Dozarea electroforetică a glicoproteinelor din serul sanguin - Glicograma	332
Electroforeza în gel	335
Electroforeza acizilor nucleici pe plăci de gel	336
Electroforeza acizilor nucleici pe coloane de gel	339
Cromatografie	343
Cromatografia pe hîrtie	344
Separare și identificarea aminoacizilor dintr-un amestec	346
Cromatografia pe gel	350
Desalinizarea preparativă a unei soluții de proteină pe Sephadex G-50 Mediu	356
Respirația tisulară	360
Fosforilarea oxidativă. Determinarea raportului P : O	366

Dozarea proteinelor din mitocondrii prin metoda biuretului	371
Dozarea activității citocromoxidazei din reticulocite	372
Dozarea activității colinesterazei serice	374
METODE SPECIALE	
Prepararea lactat dehidrogenazei	376
Prepararea ureazei	378
Prepararea hexokinazei	379
Extracția acizilor nucleici	380
Extracția acidului ribonucleic	383
Extracția acidului dezoxiribonucleic	385
Dozarea spectrofotometrică a acizilor nucleici	386
Dozarea bazelor azotate prin cromatografia pe hîrtie	387
Dozarea activității adenzindezaminazei	389
Dozarea activității 5'-AMP-dezaminazei (Metoda Kalckar modificată)	390
Dozarea activității hexokinazei	392
Dozarea activității piruvatkinazei	393
Dozarea Na și K în țesut	395
Dozarea calciului în țesut	397
Dozarea litiului în țesut	397

NOTIUNI DE VOLUMETRIE

EXPRIMAREA CONCENTRAȚIEI SOLUȚIILOR

Concentrația soluțiilor, adică acea cantitate de substanță dizolvată într-un anumit volum de soluție, se poate exprima în mai multe feluri:

1. Concentrația procentuală reprezintă cantitatea în grame de substanță dizolvată, cuprinsă în 100 ml sau 1000 ml soluție (C g % sau C g ‰)

a. Concentrația în procente de greutate - numărul de grame de substanță dizolvată în 100 g soluție. De ex. o soluție 20 % azotat de sodiu va conține 20 g NaNO_3 și 80 g H_2O .

b. Concentrația în procente de volum și greutate (concentrația procentuală mixtă) - numărul de grame de substanță dizolvată în 100 ml soluție. De ex. 100 ml dintr-o soluție 20 % NaNO_3 conține 20 g NaNO_3 completată cu apă până la 100 ml.

c. Concentrația în procente de volum - numărul de ml de substanță dizolvată în 100 ml soluție. De ex. o soluție 5 % acid acetic conține 5 ml acid acetic și 95 ml apă.

2. Concentrația molară sau molaritatea (M) unei soluții, reprezintă numărul (întreg sau fracționar) care arată câte molecule gram de substanță dizolvată se află în 1000 ml soluție.

O soluție molară este o soluție care conține o moleculă gram substanță dizolvată la 1 litru soluție.

Pentru prepararea unei soluții molare se calculează mai întâi greutatea moleculară a substanței respective care este egală cu suma greutăților atomice ale atomilor componenți.

Pentru a prepara soluții de diferite molarități se calculează cantitatea în grame de substanță ce trebuie dizolvată prin înmulțirea greutății moleculare cu molaritatea. De ex. pentru prepararea unei soluții de NaCl 0,5 M, se va cântări $58 \times 0,5 = 29$ g NaCl. Această cantitate se va dizolva în 1000 ml soluție.

3. Cocentrția normală sau normalitatea (N) unei soluții, reprezintă numărul (întreg sau fracționar) care arată câți echivalenți gram (vali) de substanță sînt dizolvați în 1000 ml soluție.

O soluție normală conține 1 echivalent gram la 1 litru.

Se numește echivalent, cantitatea de substanță în greutate care, într-o reacție chimică dată, poate înlocui sau lega 8 părți în greutate de oxigen sau 1,008 părți în greutate de hidrogen.

Cantitatea de substanță în grame, egală numeric cu echivalentul, se numește echivalent gram (E).

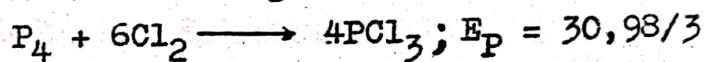
Echivalentul nu este o mărime invariabilă cum sînt greutatea atomică și greutatea moleculară.

Reacionînd în moduri diferite, aceiași

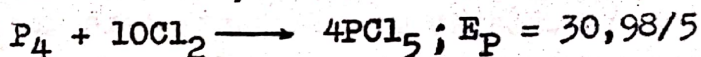
cantitate dintr-o substanță se poate combina sau poate înlocui cantități diferite de hidrogen. De aceea, la calcularea echivalentului unei substanțe, se ia în considerație reacția la care participă.

a. Echivalentul gram al unui element se calculează prin raportul dintre greutatea atomică a elementului și valența sa după reacția la care participă substanța. De ex.:

Echivalentul gram al fosforului în reacția:



sau în reacția:

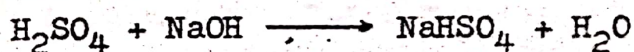


b. Echivalentul unui acid, într-o reacție de neutralizare, este egal cu greutatea moleculară a acidului împărțită prin numărul ionilor H^+ cu care participă fiecare moleculă de acid la reacție.

Echivalentul gram al HCl va fi $36,47/1$.

Echivalentul gram al $H_2SO_4 = 98,08/2$

Echivalentul acidului sulfuric nu este valabil în cazul când acidul este neutralizat parțial.



$$E_{H_2SO_4} = G.M./1 = 98,08$$

c. Echivalentul gram al bazelor este dat de raportul dintre masa moleculară respectivă și numărul grupărilor OH^- cu care fiecare moleculă de bază participă la reacție. De exemplu:

$$E_{NaOH} = 40/1; E_{Ca(OH)_2} = 74,096/2$$

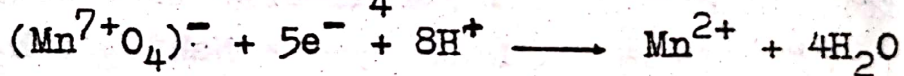
d. Echivalentul gram al sărurilor care intră în reacțiile de substituție este dat de raportul dintre masa moleculară (și apa de cristalizare) și produsul dintre numărul de cationi din moleculă și valența lor. De exemplu:

$$E_{\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}} = 270,315 / 1 \times 3$$

$$E_{\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3} = 400 / 3 \times 2$$

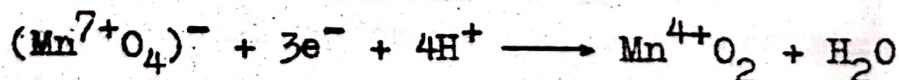
e. Echivalentul gram al oxidanților sau reducătorilor. În reacțiile redox, echivalentul gram reprezintă cantitatea de substanță care reacționează cu un electron-gram ($5,49 \times 10^{-4}$ grame electroni) și se exprimă prin raportul dintre masa moleculară și numărul de electroni schimbați (câștigați de oxidant sau pierduți de reducător) când trece de la o formă la alta. În general, în stabilirea echivalentului gram al unei substanțe, oxidant sau reducător, trebuie să se țină seama de mediul de reacție.

De exemplu E_{KMnO_4} în mediu puternic acid:



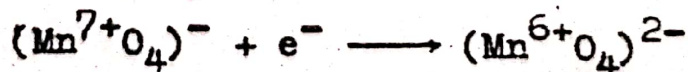
$$E_{\text{KMnO}_4} = 158,03 / 5 = 31,606$$

E_{KMnO_4} în mediu slab acid sau neutru:



$$E_{\text{KMnO}_4} = 158,03 / 3 = 52,67$$

E_{KMnO_4} în mediu puternic alcalin:



$$E_{\text{KMnO}_4} = 158,03/1$$

Numărul de echivalenți gram al uneia dintre substanțele care reacționează este egal cu al celeilalte substanțe. Deci substanțele reacționează între ele de la echivalent la echivalent.

Cunoscând concentrația în grame la mie, se poate afla molaritatea sau normalitatea unei soluții. De exemplu: Concentrația în g % = $M \times \text{G.M.}$ în care M = molaritatea; G.M. = greutatea moleculară. Deci $M = \text{g\%} / \text{G.M.}$ $M = \text{g \%} / \text{G.M.}$

sau $\text{g \%} = E \times N$ în care E = echivalentul gram ; N = normalitatea. De unde

$$N = \text{g \%} / E$$

Prepararea unei soluții de normalitate inferioară dintr-o soluție de normalitate superioară.

În general se prepară soluții mai concentrate și în momentul utilizării se diluiază la concentrația dorită. De exemplu, dacă vrem să preparăm o soluție 0,01 N dintr-o soluție 0,1 N, facem mai întâi raportul normalităților, aflând astfel diluția:

$$0,1 / 0,01 = 10.$$

Deci dacă dorim să preparăm 1000 ml soluție 0,01 N, împărțim volumul de 1000 ml la diluție

$$1000 / 10 = 100 \text{ ml.}$$

Această cantitate din soluția 0,1 N se va introduce într-un balon cotat și se va completa la 1000 ml cu apă, obținându-se astfel 1000 ml soluție 0,01 N.

Titrul unei soluții este cantitatea de substanță în grame conținută într-un ml de soluție (grame / ml).

În analizele de laborator se utilizează două feluri de soluții:

1. Soluții etalon a căror concentrații pot fi calculate prin cântărire. Titrul acestor soluții este considerat titrul teoretic (T_t). Acesta se poate afla cunoscând normalitatea soluției.

De ex. titrul teoretic al soluției 0,1 N de clorură de sodiu:

$$\begin{array}{rcl} \text{Dacă la 1000 ml soluție} & \dots & E \times N \text{ (58x0,1)} \\ \text{1 ml} & \dots & T_t \end{array}$$

$$T_t = \frac{E \times N}{1000} = \frac{58 \times 0,1}{1000} \text{ g/ml}$$

Pentru ca o substanță să poată fi utilizată la prepararea unei soluții etalon, trebuie să fie pură, să aibă o compoziție bine determinată, să fie stabilă în condițiile de lucru și să aibă un echivalent cât mai mare pentru ca erorile de cântărire să fie neînsemnate. Ca substanță etalon se utilizează Na_2CO_3 anhidru, acid oxalic, oxalatul de sodiu, bicromatul de K, etc.

② Soluții titrate a căror titru nu poate fi calculat prin cântărire. Se prepară o soluție de concentrație aproximativă și se stabilește titrul real (T_r) prin titrare.

Stabilirea titrului real se face prin titrare cu o substanță etalon sau prin titrare cu un volum cunoscut de soluție etalon.

Conform legii echivalenței:

$$\frac{E_{et} \cdot \dots \cdot E_x}{n_1 \cdot T_{t(et)} \cdot \dots \cdot n_2 \cdot T_r}$$

$$T_r = \frac{n_1}{n_2} \cdot \frac{T_{t(et)} \cdot E_x}{E_{et}}$$

Inlocuind T_t prin valoarea lui $\frac{E_{et} \cdot N_{et}}{1000}$

va rezulta:
$$T_r = \frac{n_1}{n_2} \cdot \frac{E_x \cdot N_{et}}{1000}$$

în care: E_{et} = echivalentul gram al substanței etalon

E_x = echivalentul gram al substanței de cercetat

T_t = titrul teoretic al soluției etalon

T_r = titrul real al soluției de cercetat

n_1 = ml soluție etalon

n_2 = ml soluție de cercetat.

Factorul soluției. In cazul când soluțiile preparate nu au o normalitate exactă, aceasta se poate calcula prin înmulțirea cu un factor de corecție.

Factorul reprezintă numărul cu care trebuie înmulțit numărul de ml de soluție de normalitate aproximativă pentru a se obține numărul de ml de soluție de normalitate precisă. Se calculează raportînd ml de soluție de normalitate precisă la ml de soluție de normalitate aproximativă sau raportînd titrul real

la titrul teoretic.

$$F = \frac{n_1 \text{ precis}}{n_2 \text{ aprox.}} = \frac{T_r}{T_t}$$

Punctul de echivalență sau sfârșitul reacției este marcat de virarea culorii indicatorului.

Indicatorii sînt substanțe organice care la punctul de echivalență își schimbă brusc una din proprietăți, de obicei culoarea.

În cazul în care una din substanțe este colorată nu mai este nevoie de indicator; o picătură în plus din această soluție indică sfârșitul reacției. (ex. permanganatul de potasiu).

După metoda de analiză folosită avem:

- indicatori de neutralizare
- indicatori redox
- indicatori ce formează compuși greu solubili cu soluția de titrat,
- indicatori ce formează compuși greu solubili și colorați cu soluția de titrat.

ANALIZA VOLUMETRICĂ

Analiza volumetrică se bazează pe măsurarea volumului soluției de concentrație cunoscută (etalon) consumată în reacția cu substanța de analizat. La baza fiecărei metode de analiză volumetrică stă un anumit tip de reacție.

În funcție de tipul de reacție, metodele de analiză volumetrică se clasifică astfel:

- metoda neutralizării (acidimetria și alcalimetria);
- metoda oxido-reducerii (oxidimetria);
- metoda precipitării și complexării.

ACIDIMETRIE SI ALCALIMETRIE

Prepararea și titrarea NaOH aproximativ 0,1 N

Deoarece NaOH nu este o substanță stabilă nu se poate prepara o soluție de normalitate exactă prin cântărire. Se va stabili titrul și factorul soluției de NaOH cu ajutorul unei soluții etalon de acid oxalic.

Echivalentul gram al NaOH este 40,005, deci pentru a prepara o soluție 0,1 N se vor cântări 4,0005 g NaOH pentru 1000 ml soluție.

Datorită faptului că NaOH se carbonatează, stratul de carbonat se îndepărtează înainte de prepararea soluției. Pentru aceasta se cântărește la balanța tehnică o cantitate ceva mai mare (aproximativ 5 g NaOH) decât cea rezultată în urma calculului, se va trece într-un pahar și se va spăla foarte repede de 3-4 ori cu apă distilată, după care se dizolvă și se aduce într-un balon cotat de 1000 ml. Se completează cu apă distilată, la semn.

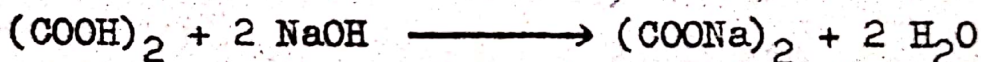
Prepararea soluției etalon de acid oxalic.

Echivalentul acidului oxalic în reacția de neutralizare este $126,068/2 = 63,034$. Pentru a prepara o soluție 0,1 N se cântărește la balanța analitică 6,3034 g acid oxalic, se aduce cantitativ într-un balon cotaț de 1000 ml și se completează la semn cu apă distilată.

Titrarea soluției de NaOH

Principiu

Se titrează o cantitate cunoscută de acid oxalic 0,1 N cu NaOH în prezența fenolftaleinei ca indicator pînă la viraj slab roz:



Reactivi

1. Acid oxalic 0,1 N
2. NaOH 0,1 N
3. Sol.fenolftaleină, indicator, 1 % în alcool 70°

Modul de lucru

Intr-un balon Erlenmeyer de 100 ml se pipetează 10 ml soluție etalon de acid oxalic, se încălzește la 60-70°C (preferabil pe baie de apă) pentru îndepărtarea CO₂ liber din soluție. Trebuie evitată încălzirea prea puternică a soluției pentru a nu se descompune acidul oxalic.

Se adaugă 3-4 picături fenolftaleină și se titrează cu NaOH din biuretă pînă la viraj slab roz persistent. Se repetă operația, făcîndu-se media a trei determinări.

Se notează n_1 = ml soluție acid oxalic și n_2 = ml NaOH utilizați la titrare.

$$T_{\text{NaOH}} = \frac{n_1}{n_2} \times \frac{40,005 \times 0,1}{1000}$$

ACIDIMETRIE

PREPARAREA SI TITRAREA SOLUTIEI DE HCl 0,1 N

Acidul clorhidric conc. conține 37 g % HCl gazos; $d = 1,19$. Echivalentul gram al HCl este egal cu masa lui moleculară (36,47 g).

Pentru prepararea unei soluții 0,1 N ar trebui să se cântărească 3,647 g HCl gazos la 1000 ml soluție. Se calculează ml HCl conc. care conțin 3,647 g HCl gazos:

100 g HCl conc.	37 g HCl gazos
x	3,647 g "

$$x = \frac{3,647 \times 100}{37} = 9,85 \text{ g HCl conc.}$$

Stiind că $G = V \times d$, calculăm volumul de acid clorhidric conc. care conține 9,85 g HCl.

$$V = \frac{G}{d} = \frac{9,85}{1,19} = 8,28 \text{ ml HCl conc.}$$

Acest volum de 8,28 ml HCl se introduce într-un balon cotat de 1000 ml în care se află aproximativ 200 ml apă distilată, după care se completează la semn cu apă distilată.

Titrul soluției de HCl se stabilește cu

soluție etalon de carbonat de sodiu.

Prepararea soluției etalon de Na_2CO_3 0,1 N

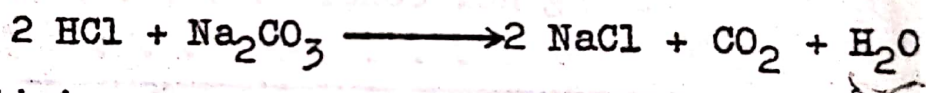
Echivalentul Na_2CO_3 anhidru este
 $105,988/2 = 52,994$

Pentru prepararea soluției 0,1 N se cântărește la balanța analitică 5,2994 g Na_2CO_3 anhidru, se aduce cantitativ într-un balon cotate de 1000 ml și se completează la semn cu apă distilată.

Titrarea soluției de HCl 0,1 N

Principiu

Se titrează o cantitate cunoscută de soluție etalon de Na_2CO_3 0,1 N cu soluția HCl aproximativ 0,1 N în prezență de metil orange până la schimbarea culorii de la galben (mediu alcalin) la portocaliu (mediu acid).



Reactivi

1. Sol. acid clorhidric 0,1 N
2. Sol. carbonat de sodiu anhidru 0,1 N
3. Sol. metil orange, indicator.

Modul de lucru

Intr-un balon Erlenmeyer de 100 ml se pipetează 10 ml (n_1) soluție HCl, se adaugă 1-2 picături metil orange și se titrează cu HCl din biuretă până la virajul indicatorului de la galben la portocaliu. Se îndepărtează CO_2 prin fierbere timp de

2 minute, se răcește și dacă soluția devine din nou galbenă, se titrează pînă la portocaliu(n_2 = ml HCl 0,1 N utilizați în total la titrare). Se repetă de 2 - 3 ori operația, făcîndu-se media determinărilor.

$$T_{HCl} = \frac{n_1}{n_2} \times \frac{36,47 \times 0,1}{1000}$$

În cazul cînd soluția de HCl este mai concentrată decît 0,1 N se poate aduce la normalitate exactă prin diluție. De exemplu:

Dacă prin titrare am consumat 9,5 ml soluție HCl, deci soluția noastră de HCl este mai concentrată, se va adăuga apă după următorul calcul:

10 ml HCl		0,5 ml apă
1000 ml HCl		x

$$x = \frac{1000 \times 0,5}{10} = 50 \text{ ml apă distilată.}$$

Într-un balon cotat de 1000 ml se introduc 50 ml apă distilată și se completează la semn cu soluție HCl aproximativ 0,1 N. Se verifică titrul soluției corectate.

În cazul cînd soluția nu a fost adusă la normalitate exactă, se utilizează factorul de corecție.

PREPARAREA SI TITRAREA SOLUTIEI DE H_2SO_4 0,1 N

Se procedează la fel ca și pentru soluția de acid clorhidric 0,1 N.

PRIM MANGANOMETRIEPREPARAREA SI TITRAREA SOLUTIEI DE KMnO_4 0,1 N

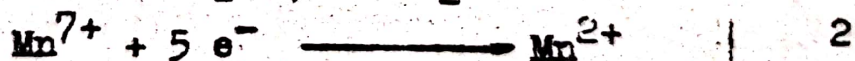
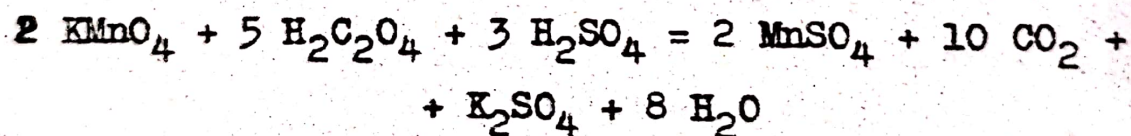
În mediu puternic acid, echivalentul gram al KMnO_4 este $158,03/5 = 31,606 \text{ g}$.

Pentru prepararea soluției 0,1 N se va cântări aproximativ 3,2 g KMnO_4 , care se dizolvă în 1000 ml apă distilată. Se ține apoi soluția pe o baie de apă la fierbere aproximativ 1 oră pentru oxidarea eventualelor substanțe organice. După răcire se filtrează pentru îndepărtarea MnO_2 format în urma reducerii KMnO_4 . Soluția se păstrează în sticlă brună.

Determinarea titrului soluției de KMnO_4 se face cu acid oxalic, oxalat de sodiu sau trioxid de arsen.

Titrare soluției de KMnO_4 0,1 NPrincipiu

KMnO_4 în mediu acid oxidează acidul oxalic la CO_2 , el reducându-se la cation manganos:

Reactivi

1. Sol. etalon acid oxalic 0,1 N

2. Acid sulfuric 25 %
3. Sol. permanganat de potasiu 0,1 N

Modul de lucru

Intr-un balon Erlenmeyer de 100 ml se pipetează 10 ml soluție acid oxalic 0,1 N (n_1), se adaugă 5 ml acid sulfuric 25 %, se încălzește la 75-80° C pe baie de apă și se titrează cu KMnO_4 pînă la apariția culorii roz. La început culoarea KMnO_4 dispare lent, deoarece viteza de reacție este mai mică, apoi cînd în soluție apar ionii Mn^{2+} , sub acțiunea catalitică a acestora, decolorarea are loc imediat. Titrarea se va face sub agitare mai puternică la început și nu se va adăuga o nouă picătură de permanganat pînă ce culoarea roz nu dispare complet. Se continuă titrarea pînă cînd culoarea roz pal nu mai dispare. In acest moment reacția este terminată. Se notează numărul de ml de KMnO_4 consumați cu n_2 .

$$T_{\text{KMnO}_4} = \frac{n_1}{n_2} \times \frac{31,606 \times 0,1}{1000}$$

IODOMETRIE

PREPARAREA SI TITRAREA SOLUTIEI DE $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N

Echivalentul gram al $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ este
 $248,19/1 = 248,19 \text{ g}$

Pentru prepararea soluției 0,1 N se cîntăresc 25 g tiosulfat de sodiu, care se dizolvă într-un balon cotate de 1000 ml cu apă distilată fiartă și

răcită, lipsită de CO_2 . În aceste condiții soluția își va păstra titrul un timp mai îndelungat. Se va păstra în sticlă brună, la adăpost de CO_2 și aer, care schimbă titrul soluției.

Determinarea titrului soluției de tiosulfat se face cu substanțe etalon oxidante: bicromat de potasiu, iodat de potasiu sau cu o soluție de permanganat de potasiu de titru cunoscut.

Prepararea soluției etalon de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,1 N

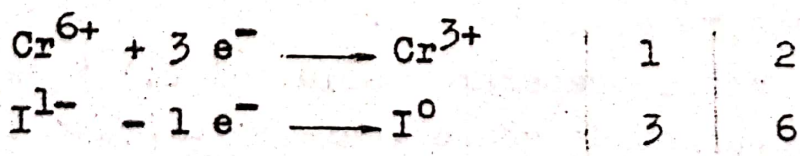
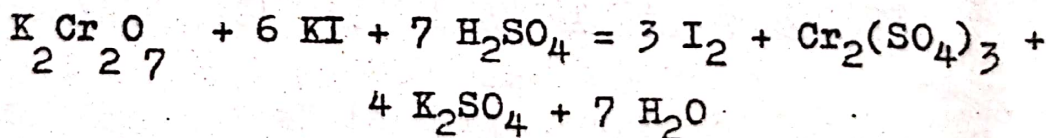
Echivalentul gram al $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ este egal cu $294,192/6 = 49,032$ g.

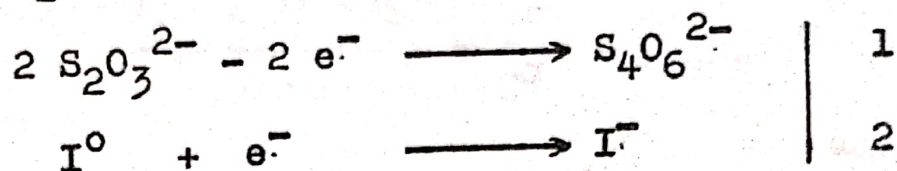
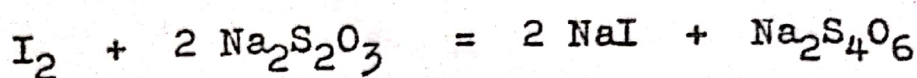
Pentru prepararea soluției 0,1 N, se cântărește la balanța analitică 4,9032 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ p.a., se aduce cantitativ într-un balon cotat de 1000 ml și se completează la semn cu apă distilată.

Tittrarea soluției de tiosulfat 0,1 N

Pricipiu

Bicromatul de potasiu în mediu puternic acid, descompune iodura de potasiu punând în libertate o cantitate de iod echivalentă cu cantitatea de bicromat luată în lucru. Iodul se titrează cu tiosulfat de sodiu în prezența amidonului ca indicator.





Reactivi

- 1, Sol. bicromat de potasiu 0,1 N
- 2, Sol. tiosulfat 0,1 N
- 3, Sol. acid sulfuric 25 %
- 4, Sol. iodură de potasiu 10 %
5. Sol. amidon indicator:

Se dizolvă 27 g NaCl în puțină apă și se încălzește la fierbere. Se adaugă 1 g amidon amestecat cu 5 ml apă distilată rece. Se continuă fierberea până la clarificare. Se răcește, se filtrează și se completează cu apă distilată la 100 ml.

Modul de lucru

Intr-un flacon de titrare cu dop rodat (flacon iodometric) se pipetează 10 ml bicromat de K (n_1), se adaugă 10 ml H_2SO_4 25 %, apă distilată fiartă și răcită 50 ml și 10 ml iodură de K. Se lasă la întuneric 10 minute pentru eliberarea iodului.

Soluția colorată în brun datorită iodului pus în libertate se titrează cu tiosulfat până la colorația galben pai, se adaugă 1 ml amidon, se titrează cu tiosulfat în continuare până la dispariția culorii albastre.

Se notează numărul de ml de tiosulfat consumați în total cu n_2 .

$$T_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} = \frac{n_1}{n_2} \times \frac{248,19 \times 0,1}{1000}$$

PREPARAREA SI TITRAREA SOLUTIEI DE IOD 0,1 N

Pentru prepararea unei soluții de iod, se va utiliza iod pur, care se poate obține prin sublimări repetate. Deoarece iodul este greu solubil în apă, se va dizolva într-o soluție de iodură de K.

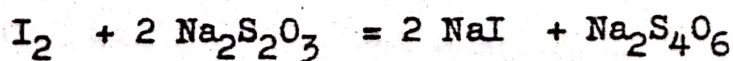
Pentru soluția 0,1 N se cântăresc 12,7 g I_2 într-o fiolă de cântărire cu dop rodat. Această cantitate de iod se dizolvă într-o soluție foarte concentrată de iodură de potasiu (30 g KI în puțină apă). După completa dizolvare a iodului în soluția de iodură de potasiu, se completează la 1 litru cu apă distilată. Soluția astfel preparată se păstrează în sticle brune.

Determinarea titrului soluției de iod, se poate face cu substanțe etalon ca: trioxid de arsen, As_2O_3 sau cu o soluție de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ de titru cunoscut.

Titrare soluției de iod 0,1 N

Principiu

Titrare se bazează pe reducerea I_2 la I^- cu tiosulfat în prezența amidonului ca indicator, pînă la viraj incolor, conform reacției:



Reactivi

1. Sol. tiosulfat de sodiu 0,1 N
2. Sol. iod 0,1 N
3. Sol. amidon, indicator.

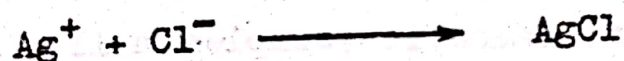
Modul de lucru

Intr-un flacon de titrare se pipetează exact 10 ml soluție de iod (n_1) și se titrează cu tiosulfat de sodiu pînă la galben pal. Se adaugă 1 ml amidon, soluția devine albastră, după care se continuă titrarea pînă la decolorarea soluției. Se notează cu n_2 numărul de ml de tiosulfat consumat.

$$T_{I_2} = \frac{n_2 \cdot f}{n_1} \times \frac{126,92 \times 0,1}{1000}$$

ARGENTOMETRIA

Argentometria se bazează pe reacțiile de formare a halogenurilor de Ag greu solubile:



Există mai multe variante de titrare cu azotat de argint:

a) Titrarea directă (metoda Mohr) utilizînd ca indicator soluție de cromat de potasiu.

b) Titrarea excesului de azotat de argint cu soluție de sulfocianură de amoniu (metoda Volhard) în prezența alaurului feri-amoniacal ca indicator.

c) Titrarea directă cu azotat de argint

în prezența indicatorilor de adsorbție (eozină, fluoresceină, etc.).

Pe principiul acestor titrări se bazează dozarea clorurilor din ser și urină, pentru care se utilizează o soluție de AgNO_3 și NH_4SCN de o anumită concentrație, astfel ca $1 \text{ ml } \text{AgNO}_3 = 1 \text{ ml } \text{NH}_4\text{SCN} = 0,001 \text{ g clor}$.

Metodele sînt descrise în capitolul "Electroliți".

CHELATOMETRIA

Se bazează pe reacția de formare a complexilor coordinativi, foarte stabili, denumiți chelați.

Agenții de chelatare sau complexonii constituie o grupă de reactivi organici, derivați ai acizilor policarboxilici, cum ar fi: acidul nitrilo-triacetic (NTA), complexon I), acid etilendiamino-tetraacetic (complexon II), sarea disodică a acidului etilendiamino-tetraacetic (Complexon III, EDTA, trilon B, versen, idranal). Cel mai utilizat dintre acești compuși este complexonul III.

Punctul de echivalență în titrarea cu complexon III se determină cu ajutorul indicatorilor complexometrici sau indicatori metalocromici. Dintre aceștia cei mai utilizați sînt: murexidul (purpuratul de amoniu), negru eriocrom T, violet de pirocatechină, ditizona.

Unii indicatori complexometrici sînt și indicatori de pH; de aceea în analiza complexometrică este necesar să se lucreze la pH constant folosind în acest scop soluții tampon.

Metoda se aplică la dozarea cationilor bivalenți: Ca^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} , (vezi capitolul electroliți).

S O L U T I I T A M P O N

Apa, oricît ar fi de pură, prezintă o slabă conductibilitate electrică ceea ce dovedește că este foarte puțin disociată. Ordinul de mărime al acestei disocieri este de 7 molecule disociate la o sută de milioane de molecule nedisociate.

Aplicînd legea acțiunii maselor în cazul disocierii apei vom avea:

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

Deoarece numitorul acestei fracții este foarte mare și variațiile lui sînt neînsemnate față de ordinul său de mărime, se poate formula:

$$[H^+][OH^-] = \text{constant} = K_{H_2O}$$

Determinarea acestei constante duce la:

$$\frac{0,74}{10^{14}} = 0,74 \times 10^{-14} = 10^{-14,14} \text{ la}$$

18°C.

Apa fiind neutră $[H^+] = [OH^-]$ deci

$$[H^+] = 10^{-14,14} = 10^{-7,07}$$

$$[OH^-] = 10^{-7,07}$$

Considerînd logaritmul acestor expresii vom avea: $\log [H^+] = -7,07$ și $\log [OH^-] = -7,07$

Söerensen a propus notarea cu pH pentru logaritmul cu semn schimbat a concentrației ionilor de hidrogen ai unei soluții:

$$-\log [H^+] = pH \quad \text{și} \quad -\log [OH^-] = pOH$$

În apă vom avea deci $pH + pOH = 14,14$ la temperatura de $18^\circ C$.

Adăugarea unui acid în apă face să dispară un număr de OH^- și să crească concentrația H^+ , iar adăugarea de OH^- va duce la scăderea concentrației H^+ și creșterea OH^- .

Intr-o soluție neutră, acidă sau bazică există totdeauna cele două feluri de ioni. Ceea ce diferă de la o soluție la alta este proporția acestor ioni. O concentrație mai mare în H^+ indică un pH acid, valoarea lui fiind mai mică decât 7. Un pH mai mare de 7 indică alcalinitatea soluției.

În reacțiile de neutralizare soluțiile se comportă în mod diferit; unele suferă variații mari de pH la adăugarea de bază sau acid iar altele mult mai puțin.

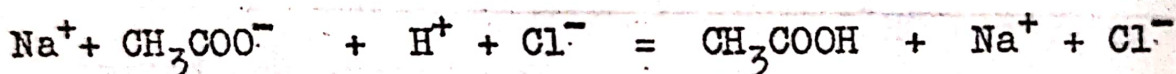
Rezistența unei soluții la variația pH-ului după adăugarea de bază sau acid tare se numește efect tampon.

Efectul tampon este foarte pronunțat la soluțiile constituite dintr-un amestec de bază slabă și sarea ei cu un acid tare sau dintr-un acid slab și sarea sa cu o bază tare.

Amestecul care are proprietatea de a împiedica variația pH-ului soluției la adăugarea de bază sau acid puternic se numește amestec tampon sau sistem tampon.

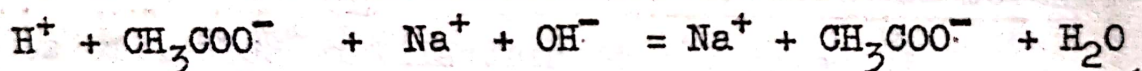
Ca sistem tampon funcționează și substanțele amfotere (aminoacizi).

Dacă la o soluție tampon (acid acetic - acetat) se adaugă un acid tare (HCl), dintre cele două substanțe care formează sistemul va interveni acetatul de sodiu după reacția:



cu formarea de acid acetic puțin disociat; pH-ul sistemului nu variază sensibil.

Dacă la același sistem se introduc ioni de OH^- (NaOH) va interveni cea de a doua substanță a sistemului tampon, acidul acetic, după reacția:



Prin formarea apei, pH-ul rămîne constant.

Cele mai utilizate sisteme tampon sînt:

1. Fosfat disodic - fosfat monopotasic M/15 (pH 5-8)

Sol.A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 11,866 g

Apă distilată pînă la 1000 ml

Sol.B: KH_2PO_4 9,073 g

apă distilată pînă la 1000 ml

2. Glicocol - HCl (pH 1,1 - 3,5)

Sol.A: glicocol 7,507 g

NaCl 5,84 g

apă distilată pînă la 1000 ml

Sol.B: HCl 0,1 N

3. Glicocol - NaOH (pH 8,6 - 12,9)

Sol.A: glicocol 7,507 g

NaCl 5,84 g

apă distilată pînă la 1000 ml

Sol.B: NaOH 0,1 N

4. Citrat - HCl (pH 1,1 - 4,9)

Sol.A: acid citric 21,014 g în 100 ml apă

NaOH N 200 ml

apă distilată pînă la 1000 ml

Sol.B: HCl 0,1 N

5. Citrat - NaOH (pH 5 - 6,6)

Sol.A: citrat (aceeași soluție ca la 4)

Sol.B: NaOH 0,1 N

6. Borat - HCl (pH 7,8 - 8,9)

Sol.A: acid boric 12,367 g în 100 ml apă

NaOH 1 N 100 ml

apă distilată pînă la 1000 ml

Sol.B: HCl 0,1 N

7. Borat - NaOH (pH 9,3 - 11,0)

Sol.A: aceeași soluție ca la 6

Sol.B: NaOH 0,1 N

8. Tris - HCl (pH 7,2 - 9,1)

Sol.A: Tris (hydroximetilaminometan) 0,2 M
(24,23 g)

apă distilată pînă la 1000 ml

Sol.B: HCl 0,1 N

9. Tris - maleat (pH 5,2 - 8,6)

Sol.A: tris 0,2 M (24,23 g)

anhidridă maleică 19,8 g

apă distilată pînă la 1000 ml

Sol.B: NaOH 0,2 M

Tamponul Tris - HCl

pH	Tris 0,2 M ml	HCl 0,1 N ml	Apă dist. ml
5,20	25	45	130
5,36	25	42,5	132,5
5,54	25	40	135
5,66	25	37,5	137,5
5,77	25	35	140
5,87	25	32,5	142,5
5,96	25	30	145
6,05	25	27,5	147,5
6,14	25	25	150
6,23	25	22,5	152,5
6,32	25	20	155
6,40	25	17,5	157,5
6,50	25	15	160
6,62	25	12,5	162,5
6,74	25	10	165
6,92	25	7,5	167,5
7,10	25	5	170

Tampon Tris - maleat

pH	Tris 0,2 M ml	NaOH 0,2 M ml	Apă dist. ml
5,2	50	7	143
5,4	50	10,8	139,2
5,6	50	15,5	134,5
5,8	50	20,5	129,5
6,0	50	26,0	124
6,2	50	31,5	117,5
6,4	50	37	113
6,6	50	42,5	107,5
6,8	50	45	105
7,0	50	48	102
7,2	50	51	99
7,4	50	54	96
7,6	50	58	92
7,8	50	63	87
8,0	50	69	81
8,2	50	75	75
8,4	50	81	69
8,6	50	86,5	63,5

Amestecuri tampon după Söerensen pentru
pH 1,1 - 12,9 (20°C)

pH	Glicocol ml	HCl ml	Citrat ml	HCl ml
1,1	5,7	94,3	4,8	95,2
1,2	14,6	85,4	11,1	88,9
1,3	22,6	77,4	15,9	84,1
1,4	28,9	71,1	19,3	80,7
1,5	33,8	66,2	22,2	77,8
1,6	38,0	62,0	24,6	75,4
1,7	41,7	58,3	26,5	73,5
1,8	45,3	54,7	28,2	71,8
1,9	48,9	51,1	29,5	70,5
2,0	51,9	48,1	30,6	69,4
2,1	54,9	45,1	31,7	68,3
2,2	57,6	42,4	32,6	67,4
2,3	60,3	39,7	33,6	66,4
2,4	63,4	36,6	34,5	65,5
2,5	66,6	33,4	35,4	64,6
2,6	69,9	30,1	36,4	63,6
2,7	72,8	27,2	37,3	72,7
2,8	76,0	24,0	38,3	61,7
2,9	79,2	20,8	39,3	60,7
3,0	82,1	17,9	40,3	59,7
3,1	84,8	15,2	41,5	58,5
3,2	87,1	12,9	42,7	57,3
3,3	89,2	10,8	44,0	56,0
3,4	91,0	9,0	45,4	54,6
3,5	92,5	7,5	46,8	53,2

pH	Citrat ml	HCl ml	NaOH ml	Na ₂ HPO ₄ ml	KH ₂ PO ₄ ml
3,6	48,4	51,6			
3,7	50,1	49,9			
3,8	51,9	48,1			
3,9	53,8	46,2			
4,0	56,0	44,0			
4,1	58,5	41,5			
4,2	61,1	38,9			
4,3	64,3	35,7			
4,4	67,9	32,1			
4,5	71,9	28,1			
4,6	76,9	23,1			
4,7	82,2	17,8			
4,8	88,0	12,0			
4,9	95,6	4,4			
5,0	96,4		3,6	0,95	99,5
5,1	90,3		9,7	1,35	98,65
5,2	85,1		14,9	1,8	98,2
5,3	80,4		19,6	2,3	97,7
5,4	76,3		23,7	3,0	97,0
5,5	72,3		27,7	3,9	96,1
5,6	69,0		31,0	4,9	95,1
5,7	66,0		34,0	6,2	93,8
5,8	63,6		36,4	7,9	92,1
5,9	61,5		38,5	9,8	90,2
6,0	59,6		40,4	12,1	87,9
6,1	58,0		42,0	15,0	85,0
6,2	56,6		43,4	18,4	81,6

pH	Citrat ml	NaOH ml	Na ₂ HPO ₄ ml	KH ₂ PO ₄ ml	Borat ml	HCl ml
6,3	55,4	44,6	22,1	77,9		
6,4	54,6	45,4	26,4	73,6		
6,5	53,7	46,3	31,3	68,7		
6,6	53,0	47,0	37,2	62,8		
6,7			43,0	57,0		
6,8			49,2	50,8		
6,9			55,2	44,8		
7,0			61,2	38,8		
7,1			67,0	33,0		
7,2			72,6	27,4		
7,3			77,7	22,3		
7,4			81,8	18,2		
7,5			85,2	14,3		
7,6			88,5	11,5		
7,7			91,2	8,8		
7,8			93,6	6,4	53,4	46,6
7,9			95,5	4,5	54,65	43,35
8,0			96,6	3,4	55,85	44,15
8,1					57,15	42,85
8,2					58,65	41,35
8,3					60,7	39,3
8,4					62,95	37,05
8,5					65,25	34,75

pH	Borat ml	HCl ml	NaOH ml	Glicocol ml	NaOH ml
8,6	68,0	32,0		94,2	5,8
8,7	71,2	28,8		92,9	7,1
8,8	75,5	24,5		91,4	8,6
8,9	80,5	19,5		89,6	10,4
9,0				87,6	12,4
9,1				85,4	14,6
9,2				83,0	17,0
9,3	91,1		8,9	80,3	19,7
9,4	84,6		15,4	77,7	22,3
9,5	79,0		21,0	74,8	25,2
9,6	73,2		26,8	72,0	28,0
9,7	67,7		32,3	69,0	31,0
9,8	63,7		36,3	66,2	33,8
9,9	61,0		39,0	63,8	36,2
10,0	59,0		41,0	61,7	38,3
10,1	57,3		42,7	59,8	40,2
10,2	56,0		44,0	58,1	41,9
10,3	54,8		45,2	56,5	43,5
10,4	53,7		46,3	55,2	44,8
10,5	52,8		47,2	54,2	45,8
10,6	52,0		48,0	53,3	46,7
10,7	51,4		48,6	52,6	47,4
10,8	50,9		49,1	52,0	48,0
10,9	50,5		49,5	51,5	48,5
11,0	50,1		49,9	51,1	48,9

pH	Glicocol ml	NaOH ml
11,1	50,47	49,53
11,2	50,2	49,8
11,3	49,8	50,2
11,4	49,4	50,6
11,5	49,0	51,0
11,6	48,6	51,4
11,7	48,1	51,9
11,8	47,4	52,6
11,9	46,6	53,4
12,0	45,6	54,5
12,1	44,2	55,8
12,2	42,6	55,4
12,3	40,6	59,4
12,4	38,2	61,8
12,5	34,6	65,4
12,6	30,0	70,0
12,7	25,0	75,0
12,8	19,0	81,0
12,9	10,0	90,0

PRELUCRAREA MATERIALULUI BIOLOGIC

RECOLTAREA SI PRELUCRAREA LA RECE

Pentru determinarea activității enzimatică se utilizează următoarele materiale biologice:

- omogenate tisulare
- hemolizate de sânge
- serul sanguin

Omogenate tisulare

În prepararea omogenatelor tisulare se disting două etape de lucru:

- a) Obținerea omogenatului prin distrugerea structurii tisulare și ruperea membranei celulare.
- b) Fraționarea subcelulară și separarea particulelor.

Această distrugere a structurii țesuturilor și celulelor se face în așa fel încât să se poată asigura condițiile :

- păstrarea structurii chimice a metaboliților
- păstrarea localizării particulelor subcelulare în celulă.

Pentru determinarea activității enzimatică

importanță deosebită are viteza și temperatura la care se lucrează, mediul de extragere și pH-ul acestuia.

a) Obținerea materialului biologic

Izolarea organului propus ca material biologic se face repede, la temperatură joasă, menținându-se în timpul manoperelor la gheață.

Ruperea membranei celulare se efectuează ținând seamă de proveniența celulelor. Pentru celulele animale se folosesc metode de desintegrare celulară mai puțin violente decât cele utilizate pentru celulele vegetale sau cele microbiene care au membrana foarte rezistentă.

Metodele de desintegrare celulară se pot grupa în :

1. Dezintegrarea termică (îngheț-dezgheț, amestec acetonă- CO_2 , alcool- CO_2 , azot lichid). Mai întâi celulele sînt congelate, după aceea se desgheață treptat la temperatura camerei. Se repetă această operație de cîteva ori. Prin înghețare se formează cristale de gheață intracelulare. La încălzirea celulelor se rup membranele prin șoc osmotic.

2. Omogenizarea mecanică este cel mai utilizat procedeu.

- mojararea cu substanțe abrazive (nisip, praf de sticlă, alumină) este aplicată în general pentru dezintegrarea bacteriilor.

- omogenizare prin zdrobire cu ajutorul omogenizatoarelor coaxiale- omogenizatoare cu piston.

Timpul de omogenizare variază în funcție de țesut, de la 30 secunde la 5 minute. Această metodă se utilizează numai pentru organe moi, cu puțin țesut conjunctiv care ar împiedeca rotirea pistonului.

3. Ultrasunetele. Se utilizează pentru liza eritrocitelor, pentru obținerea enzimelor celulare, solubile și ruperea membranelor nucleilor.

Mediile în care se face separarea au o anumită compoziție în funcție de tipul de țesut sau de particula subcelulară izolată. Rolul mediului de separare este: să favorizeze dezintegrarea celulară, să conserve structura morfologică și chimică a celulei și componentelor intracelulare.

Aceste medii au în compoziția lor zaharoză a cărei concentrație variază între 0,1 și 2,2 M. Izolările în soluție de zaharoză se realizează la un pH între 7 - 7,4.

EDTA - nl în aceste medii este folosit pentru stabilizarea sistemului oxidant al acidului α -cetoglutaric.

b) Fracționarea particulelor subcelulare

Componentele subcelulare se separă din omogenatele tisulare pe baza deosebirii lor în mărime și densitate. Fracționarea se realizează prin centrifugarea diferențială, la temperatură scăzută de 0° la + 4°C. Sedimentarea particulelor este direct proporțională cu forța centrifugă (F) a cărei valoare este determinată la rândul ei de numărul de rotații pe minut (n) și de raza rotorului (R) în cm, conform ecuației:

$$F = \frac{4\pi^2 \cdot n^2 \cdot R}{3600}$$

Este mai comod ca forța centrifugă să se exprime ca un multiplu al forței gravitaționale terestre, care acționează asupra particulelor. Această forță centrifugală relativă se notează obișnuit cu „ g ” fiind obținută din relația:

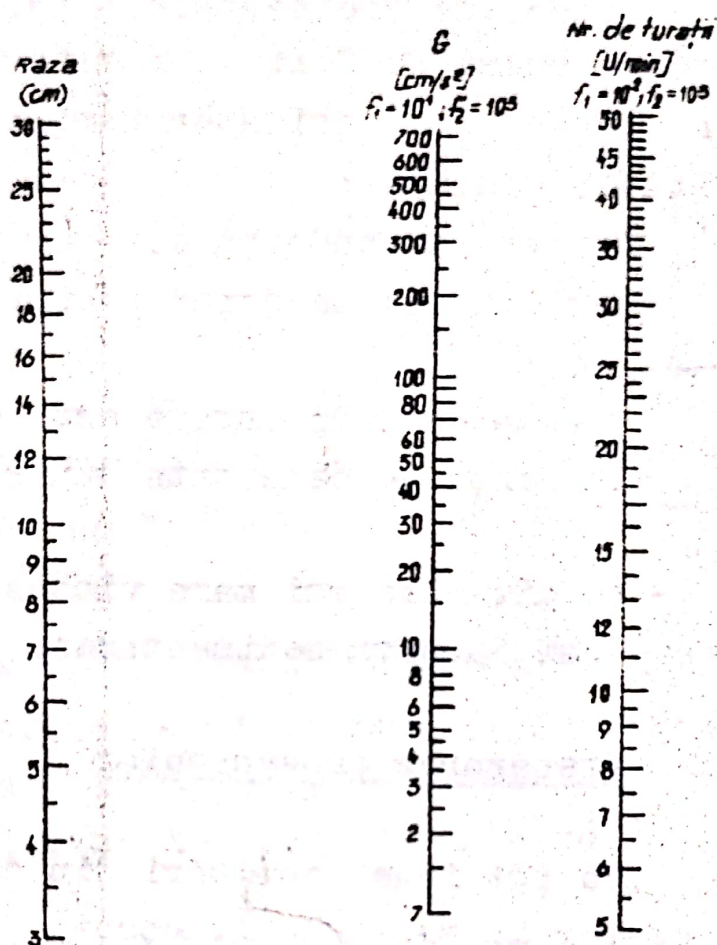
$$g = \frac{4\pi^2 \cdot n^2 \cdot R}{3600 \cdot 981} = 1,11 \cdot 10^{-5} \cdot n^2 \cdot R$$

Calcularea forței centrifugale relative (g) se face cunoscând raza (R) și numărul de rotații pe minut (n).

Pentru ușurință s-a elaborat nomograma după care, funcție de rază și de numărul de rotații se determină numărul de „ g ”.

Mărimea razei este dată de distanța de la axa de rotație a centrifugii până la fundul cupei de centrifugă (pentru centrifugile orizontale) și de distanța de la axa de rotație până la extremitatea cea mai îndepărtată a cupei (pentru cele unghiulare).

Sedimentarea materialului care trebuie îndepărtat sau izolat, depinde și de timpul cât durează centrifugarea. Timpul necesar pentru sedimentarea particulelor subcelulare este invers proporțional cu pătratul vitezei de rotație și cu pătratul razei particulei respective.



Nomograma pentru determinarea „ G ”

Exemplu: Se dă $r = 6 \text{ cm}$, $U/\text{min.} = 20 \cdot 10^3$

Se unesc punctele căutate de pe rază și numărul de rotații cu ajutorul unei linii. Punctul de intersecție pe scala din mijloc (numărul G) dă 27,5.

Numărul de rotații se multiplică cu $f_2 = 10^3$ deoarece se folosește scala mijlocie $f_2 = 10^3$, obținând astfel accelerația centrifugală $27,5 \cdot 10^3$ deci 27500 g

Viteza de sedimentare a particulelor este determinată nu numai de forța centrifugală aplicată ci și de alți factori: densitatea particulei, densitatea și vîscozitatea mediului:

Această dependență este exprimată astfel:

- particulele se depun proporțional cu pătratul razei lor;

- viteza de sedimentare este direct proporțională cu diferența de densitate dintre particule și mediu;

- cu cît este mai mare vîscozitatea mediului cu atît este mai înceată sedimentarea.

Prepararea omogenatelor

Se pot face recoltări din diferite organe ca: ficat, creier, inimă, rinichi, mușchi.

Mediile în care se face omogenizarea și sticlăria pentru lucru se păstrează la rece.

Reactivi și aparatură

1. Sol. NaCl 9 g %
2. Sol zaharoză 0,25 M
3. Omogenizator coaxial (Potter)
4. Centrifugă cu răcire

Modul de lucru

Organul prelevat căruia i se îndepărtează țesutul conjunctiv și grăsimea se presează ușor cu hîr-

tie de filtru de cîteva ori în ser fiziologic rece. Se fragmentează apoi mărunt cu un foarfece și se transvaază în eprubeta omogenizatorului.

Pentru omogenizare se adaugă la 1 g țesut proaspăt 10 ml soluție ser fiziologic rece sau soluție de zaharoză 0,25 M, se omogenizează timp de 2 minute în omogenizator coaxial (Potter) cu viteză de 1500 t/min.

Omogenatul astfel obținut se centrifughează la 700 g timp de 5 - 10 minute. Se sedimentează nucleii, celulele întregi, debriurile celulare. Supernatantul se decantează și se păstrează la rece pentru determinările enzimatică.

Standardizarea omogenatelor

Pentru a putea compara și interpreta rezultatele determinărilor biochimice pe omogenat, materialul se standardizează fie prin raportarea la greutatea produsului de plecare (standard de preparare), fie prin raportarea la conținutul proteic al omogenatului.

Standardul de preparare

Inițial organul se cîntărește. Funcție de greutatea acestuia se realizează omogenate de 10 sau 20% în diverse soluții de omogenizare. Standardizarea se obține preparînd totdeauna omogenate de aceeași concentrație.

Raportarea la conținutul de proteine este cea mai utilizată metodă.

Pentru determinarea proteinelor celulare se folosesc diverse metode.

Biuretul, care are o sensibilitate de 0,25-10 mg proteină /ml omogenat.

Lowry, este cea mai sensibilă, 10-20 μ g proteină/ml omogenat.

Metoda raportului Abs.280/Abs.260 cu sensibilitatea de 0,05 - 2 mg proteină/ml omogenat.

Hemolizatele de sînge

Sîngele se recoltează pe heparină sau perle de sticlă. Se centrifughează la rece la 4000 t/min. timp de 10 minute pentru îndepărtarea plasmei. Se spală apoi de 3 ori cu ser fiziologic, tot prin centrifugare, în proporție de 1:3.

Se face hemoliza în apă distilată rece în proporție 1 volum celule + 4 volume apă. Se centrifughează 5 minute la 2000 t/minut pentru îndepărtarea stromei.

Supernatantul este utilizat pentru determinarea activității enzimatică din eritrocite.

Dializa

Unele metode de laborator, necesită dializa hemolizatului sau a omogenatului în scopul îndepărtării unor ioni metalici. Produsul biologic este introdus într-un sac de colodiu sau de celofan, de la rinichiul artificial, dializa efectuîndu-se față de apă distilată cu EDTA 300 mg%, timp de 2 ore pînă la 24 ore, după indicațiile metodei.

Volumul produsului biologic trebuie măsurat înainte și după dializă.

Separarea mitocondriilor din ficatul de șobolan

Principiu

Elementele structurale ale celulei sînt izolate din omogenat prin centrifugare diferențială.

Reactivi

1. Sol. zaharoză 0,25 M - EDTA 0,002 M pH 7,4

zaharoză	8,5	g
EDTA	0,074	g
Apă distilată pînă la	100	ml
2. Sol. zaharoză 0,25 M

zaharoză	8,5	g
apă distilată pînă la	100	ml

Modul de lucru

Ficatul este prelevat în soluție de zaharoză 0,25 M-EDTA 0,002 M rece (pe gheață cu sare).

Se taie ficatul mărunt și se spală în soluție de zaharoză - EDTA de 2-3 ori.

Se omogenizează cu o cantitate indiferentă de zaharoză - EDTA. Se centrifughează la 600 g într-o centrifugă cu răcire timp de 10 minute.

Se decantează lichidul supernatant I.

Se mai omogenizează încă o dată depozitul rămas. Se agită și se centrifughează din nou la 600 g timp de 7 minute.

Se decantează lichidul supernatant II peste supernatantul I. Supernatantele I și II reunite se centrifughează la 5000 g timp de 20 minute.

Se decantează supernatantul și sedimentul se suspendă în zaharoză-EDTA și se omogenizează cu un piston manual.

Se centrifughează apoi la 5000 g timp de 15 minute. După această centrifugare se suspendă în soluție zaharoză 0,25 M și se omogenizează mitocondriile prin aspirație de câteva ori cu o pipetă.

Se face apoi dozarea proteinelor și se aduce la volumul respectiv pentru a avea o anumită concentrație de proteină mitocondrială/ml.

De exemplu pentru fosforilarea oxidativă 7 : mg/ml.

Stabilirea concentrației necesare de proteină

$$V \times C = D \times X$$

$$X = \frac{V \times C}{D}$$

V = volumul inițial de mitocondrii

C = concentrația inițială a proteinelor

D = concentrația necesară de proteină

$$X - V = Y$$

Y = cantitatea de lichid ce trebuie adăugată la V pentru a avea concentrația necesară de proteine/ml.

Separarea mitocondriilor din creierul de șobolan

(Metoda A.Hernandez, I.Burdett, T.S.Work)

Principiu

Mitocondriile din creier se separă din

omogenat prin centrifugare diferențiată.

Sinaptozomii sînt îndepărtați prin ruperea membranelor sinaptozomiale și scăderea presiunii osmotice.

Reactivi

1. Sol. NaCl 0,121 M - KCl 0,024 M

NaCl	0,7073 g
KCl	0,1789 g
Apă distilată pînă la	100 ml

2. Sol. zaharoză 0,3 M - EDTA 0,5 mM pH 7,4

Zaharoză	10,26 g
EDTA	0,0186 g
Apă distilată la	100 ml

3. Albumină 10 mg/ml.

Modul de lucru

Se prelevează creierul într-o soluție salină rece de NaCl 0,121 M - KCl 0,024 M. Se spală repede creierul cu această soluție și se aruncă soluția.

Se omogenizează creierul într-o soluție de zaharoză 0,3 M-EDTA 0,5 mM ajustată la pH 7,4 cu KOH.

Omogenatul final se face 10 % (g/V).

Omogenatul se centrifughează la 700 g timp de 15 minute și supernatantul, notat I, se îndepărtează și se păstrează la rece.

Depozitul se resuspendă în 1/3 din volumul inițial de zaharoză-EDTA și se centrifughează la 700 g timp de 10 minute. Se separă supernatantul II care se reunește cu supernatantul I.

Supernatantele I și II reunite se centrifughează la 12.000 g timp de 15 minute.

Depozitul de mitocondrii și sinaptosomi se resuspendă în 1/2 din volumul inițial de zaharoză-EDTA și se centrifughează la 7000 g timp de 15 minute.

Depozitul de mitocondrii și sinaptosomi este din nou suspendat în 1/3 din volumul inițial de zaharoză-EDTA și se centrifughează la 9000 g timp de 15 minute. Se îndepărtează stratul de grăsime superior.

Depozitul se amestecă cu grijă (cu o pipetă Pasteur) cu apă rece de la gheață (1,25 ml /g de cortex inițial); prin adăugare de apă scade presiunea osmotică a mediului, membranele sinaptosomiale se rup și se eliberează conținutul sinaptosomal.

După 5 minute de agitare cu grijă, presiunea osmotică a mediului este mărită prin adăugarea de albumină bovină 10 mg/ml și de 0,3 M zaharoză-0,5mM EDTA. Pentru fiecare 1 ml de apă distilată folosită se adaugă 0,2 ml albumină și 0,8 ml zaharoză-EDTA. După amestecare suspensia este centrifugată la 9000 g timp de 10 minute. Se face dozarea proteinelor și se aduce la concentrația necesară.

Prelucrarea țesuturilor pentru dozarea de electroliți

O dozare de electroliți nu poate fi exactă dacă în prealabil nu a fost realizată o distrugere

a materiilor organice.

Această distrugere se face pe două căi:

I. Incinerare (calcinare)

II. Mineralizare

I. Calcinarea constă în a distruge materia organică prin încălzire la temperaturi ridicate pînă la obținerea unui reziduu de culoare albă. Pentru aceasta se cîntărește prin metoda dublei cîntăriri un creuzet de platină în care se introduc 300 - 500 mg substanță uscată căreia i s-a determinat cantitatea de apă astfel: se introduce într-o fiolă de cîntărire o cantitate de țesut sau organ căreia urmează să i se determine conținutul de apă și se introduce într-o etuvă reglată la temperatura de 105-110°C și se lasă 24 ore. Se astupă fiola de cîntărire cu dopul, se introduce într-un exicator pînă la răcire. Se cîntărește. Se introduce din nou fiola în etuvă, se lasă cîteva ore și se repetă operația de mai sus. Se repetă această manevră pînă cînd două cîntăriri succesive dau aceeași greutate. Se ajunge la ceea ce se numește uscare pînă la greutate constantă.

Se notează:

P = g țesut proaspăt

p = g țesut uscat

Cantitatea de apă va fi dată de relația:

$$\text{apă \%} = \frac{(P-p) \cdot 100}{P}$$

Se cîntărește din nou creuzetul cu substanța, se așează apoi într-un triunghi de porțelan și se încălzește la flacăra unui bec Bunsen pînă la tempe-

ratura care nu depășește culoarea roșie închis. Dacă încălzirea se face prea puternic, sărurile alcaline (fosfați, cloruri) se topesc și înglobează în ele carbonul, sustrăgându-l astfel contactului cu oxigenul. Alte substanțe (cloruri, ioduri, bromuri) sînt volatile la temperaturi ce depășesc culoarea roșie. Din aceste motive arderea se face numai pînă la culoarea roșie închisă.

Calcinarea se continuă pînă la obținerea unei cenuși de culoare albă.

Observații

Dacă organul pregătit pentru calcinare conține cantități mari de săruri alcaline, atunci se procedează astfel: se calcinează pînă nu se mai degajă CO_2 , se lasă să se răcească, se reia rezidul cu puțină apă bidistilată. Astfel se dizolvă sărurile alcaline care înglobează carbonul. Se filtrează printr-un filtru cantitativ. Se spală filtrul pînă cînd o picătură din lichidul filtrat, prin evaporare nu lasă nici un reziduu. Astfel sărurile au trecut în filtrat. Filtrul cu conținutul său este adus în creuzet, se încălzește ușor și apoi se calcinează. Filtratul se aduce cîte puțin în creuzetul rece și apoi se evaporă. Se repetă această operație pînă la evaporarea completă a apei din filtrat. Se aduc și apele de spălare a paharului. Se termină apoi totul printr-o scurtă încălzire a creuzetului la roșu închis. Se răcește

apoi în exicator și se cîntărește.

Cantitatea de cenușă diferă de la organ la organ. În cenușă se pot doza apoi diverse elemente minerale. Cenușa este apoi dizolvată în HCl concentrat și evaporată la sec pentru eliminarea silicei, prin încălzire puțin deasupra temperaturii de 1000 C.

La țesuturile animale trebuie avut în vedere faptul că acestea la ardere se umflă și se aglomerează.

Proporția elementelor care intră în compoziția corpului uman:

Denumirea elementului	% materie vie	% materie uscată
Calciu	1,38	3,45
Sulf	0,64	1,60
Fosfor	0,63	1,58
Sodiu	0,26	0,65
Potasiu	0,22	0,55
Magneziu	0,04	0,10
Fier	0,005	0,013
Clor	0,18	0,45
Carbon	19,37	48,43

Prin această metodă se dozează litiul, calciu, magneziu, fier, mangan.

II. Mineralizarea este o metodă pe cale umedă și are drept principiu distrugerea materiei organice printr-un amestec puternic oxidant.

Reactivi

1. Acid sulfuric conc.
2. Acid azotic conc.
3. Amestec nitro - percloric

acid percloric ($d = 1,61$)	2 vol
acid azotic ($d = 1,39$)	1 vol
4. Acid clorhidric conc.

Modul de lucru

Se lucrează sub o nișă bine aerată.

a. Mineralizare cu amestec sulfo-nitro-percloric

Se introduc 4 - 10 g din fragmentul de țesut sau organ uscat și sfărâmat într-un balon Kjeldahl. Se adaugă H_2SO_4 câte 1 ml de gram de cantitate de materie uscată. Se încălzește pînă la înnegrirea amestecului. Se adaugă picătură cu picătură 20 ml HNO_3 conc. Atacul nitric este brutal și se degajă mari cantități de vapori de HNO_3 . Cînd vaporii nitrici nu se mai degajă și lichidul capătă o culoare galben pai atacul acidului azotic asupra materiei organice este terminat. Se încălzește apoi ușor pentru a elimina tot restul de HNO_3 . Prin încălzire lichidul se decolorează, se înnegrește și apoi devine vîscos. În acest moment se adaugă picătură cu picătură din amestecul nitro - percloric. La căderea fiecărei picături se degajă vapori albi de SO_3 . Se continuă adăugarea pînă la decolorarea totală cînd toată materia organică a fost distrusă.

Se obține astfel un lichid incolor în care

se găsesc solubilizate sărurile minerale. Dacă interesul analizei o cere, se golește conținutul balonului într-o capsulă de porțelan și apoi se clătește cu apă distilată care se aduce tot în capsulă. Lichidul din capsulă se evaporă în mod lent pe o baie de nisip pînă la uscare. Rezidul uscat se poate relua apoi cu apă fiartă pentru a dezagrega masa solidificată. Se poate adăuga puțin HCl pentru a dizolva eventualii fosfați insolubili.

b. Mineralizarea cu acid azotic concentrat

Aceasta permite realizarea unei mineralizări rapide a unei porțiuni dintr-un organ sau țesut. Într-o eprubetă de sticlă neutră se introduc 300-500 mg țesut uscat. Se introduce apoi o perlă de sticlă și 5 ml acid azotic concentrat. Se așează eprubeta într-o baie de apă și se încălzește pînă la dispariția completă a spumei formate. Se lasă să se răcească și apoi se introduce într-o baie cu oleu de vaselină. Se încălzește baia pînă la temperatura de 140°C și se menține fierberea pînă la evaporarea excesului de acid. Pentru ca evaporarea să se facă pe îndelete se pune în gîtul eprubetei o pîlnioară. După evaporarea acidului se ridică temperatura la 180°C . Dacă acidul se evaporă se adaugă din nou cîte 2 ml de amestec nitro-percloric avînd grijă ca eprubeta să fie rece.

În timpul distrugerii materiei organice apare mai întîi o culoare brună, apoi roșie brună și galbenă. Distrugerea este terminată cînd decolorarea este completă. Se evaporă la sîcitate.

Prin această metodă, nedepășindu-se temperatura de 180°C se pot doza și elementele volatile din substanța organică ca și Na, K, P, Cu, Pb, Sn, Bi.

ENZIME

PRINCIPII DE DOZARE A ACTIVITĂȚII ENZIMATICE ÎN ULTRAVIOLET

Determinarea activității enzimatice se face fie prin măsurarea metabolizării substratului pe unitatea de timp, fie prin măsurarea concentrației unui metabolit (de obicei substratul), înainte și după acțiunea enzimei.

Activitatea enzimatică se exprimă în unități (U) care reprezintă cantitatea de enzimă capabilă să convertească un μmol de substrat pe minut în condiții determinate.

Măsurătorile se fac la 25°C și se raportează la 1 ml de lichid biologic.

$$1 \text{ U/ml} = \frac{1 \mu\text{mol substrat transformat}}{1 \text{ minut} \times 1 \text{ ml}}$$

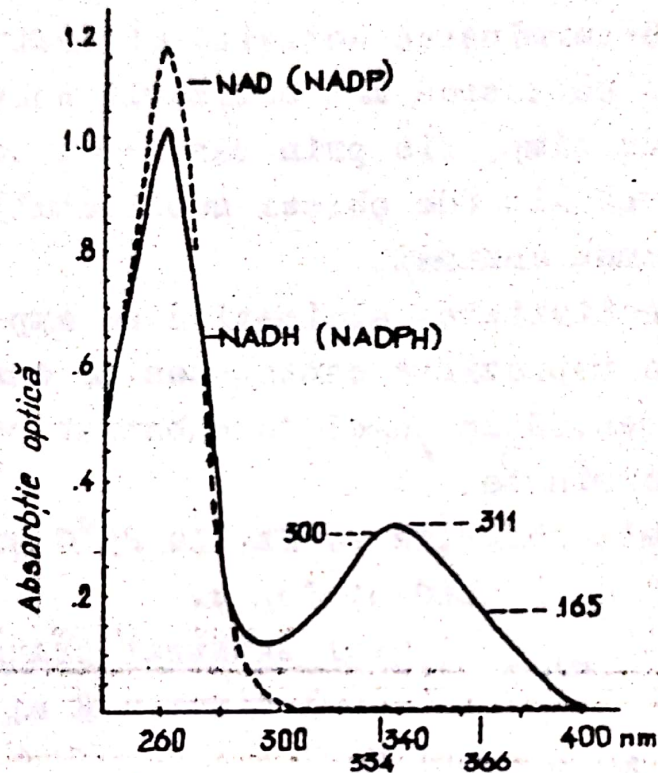
$$1 \text{ mU} = 0,001 \text{ U}$$

Dozarea spectrofotometrică a activității enzimatice utilizează testul optic al lui Warburg care se bazează pe faptul că NADH și NADPH absorb lumina ultravioletă cu un maxim la 340 nm, în timp ce formele oxidate nu prezintă acest fenomen în intervalul 300 - 400 nm.

Orice reacție a dehidrogenazelor în care NAD și NADPH sînt reduse sau NADH și NADPH sînt oxidate, poate fi măsurată prin creșterea sau descreș-

terea absorbției optice la 340 nm sau altă lungime de undă apropiată.

În figură sînt prezentate spectrele de absorbție ale NAD și NADH.



Concentrația acestor coenzime este

$$C = 0,05 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$$

La 340 nm și grosime de strat $d = 1 \text{ cm}$ absorbția NADH este $A = 0,311$.

Cunoscînd concentrația se poate calcula coeficientul de absorbție molară a NADH (ϵ):

$$A = \epsilon \times C \times d \quad \text{de unde}$$

$$\epsilon = \frac{A}{C \times d} \quad \text{sau} \quad \epsilon = \frac{A}{C} \quad \text{cînd } d = 1$$

$$\epsilon_{340} = \frac{0,311}{0,05 \times 10^{-3}} = 6,22 \times 10^3$$

$$\epsilon_{366} = \frac{0,165}{0,05 \times 10^{-3}} = 3,3 \times 10^3$$

$$\epsilon_{334} = \frac{0,300}{0,05 \times 10^{-3}} = 6,0 \times 10^3$$

Cunoscând coeficientul de absorbție molară ϵ se poate calcula concentrația coenzimei.

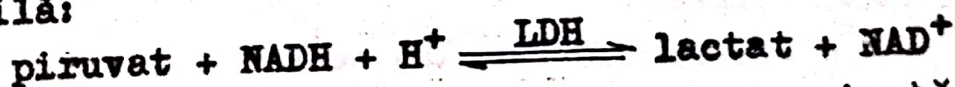
$$C = \frac{A}{\epsilon} \quad (D = 1)$$

Relația este utilizată pentru calcularea activității enzimatice.

DOZAREA ACTIVITĂȚII LACTAT DEHIDROGENAZEI IN SER

Principiu.

Lactat:NAD-oxidoreductaza sau lactat dehidrogenaza (E.C. 1.1.1.27) catalizează reacția reversibilă:



Activitatea LDH poate fi determinată prin incubarea soluției care conține enzima cu piruvat și NADH la pH = 7,4 sau lactat și NAD la pH = 8,9.

Scăderea absorbției optice la 340 nm în primul caz și creșterea absorbției în al doilea caz sînt utilizate pentru evaluarea activității enzimei.

Reactivi

1. Sol. tampon Tris-maleat 0,2 M; pH 7,4 sau tampon fosfat M/15; pH 7,4
2. Sol. piruvat de sodiu 8 mg/ml (sol. tamponată la pH 7,4)
3. Sol. NADH 7 mg/ml în NaHCO_3 1%

Modul de lucru

În cuva de cuarț de diametru 0,5 cm a spectrofotometrului se introduc:

tampon Tris-maleat pH 7,4	1,8 ml
NADH	0,03 ml
ser sau plasmă	0,1 ml

Se agită și se citește E_0 la 340 nm. Se adaugă apoi 0,1 ml sol. piruvat, se pornește cronometrul, se agită și se citește din minut în minut, timp de 5 minute extincțiile $E_1 \dots E_5$.

Dacă scăderea extincției pe minut este mai mare de 0,020, se diluiază serul cu sol. tampon pînă se obțin scăderi ale extincției cuprinse între 0,020 - 0,010.

Calcul

Se notează:

ΔE = variația extincției/minut (media a trei citiri consecutive).

V = vol. lichidului din cuvă

6,22 coeficientul de extincție molară a NADH la 340 nm

Dacă 1, μmol NADH.....6,22

x..... $\Delta E \cdot 2 \cdot V$

$$x = \frac{\Delta E \cdot 2 \cdot V}{6,22} \text{ / } \mu\text{mol NADH corespunzător}$$

volumului de ser din cuvă.

Pentru a exprima în U/ml ($\mu\text{mol/ml/min}$) rezultatul se multiplică cu 10.

$$\mu\text{mol/ml/min} = \frac{E \cdot 2 \cdot V}{6,22} \cdot 10 = \text{U/ml}$$

La calcul se ține seama de eventualele diluții.

Valori normale

Până la 195 mU/ml ser

Observații

Activitatea LDH este egală în ser și plasmă. La temperatura camerei, în 24 ore se pierde aproximativ 25% din activitatea enzimei.

În soluții diluate, enzima se inactivează rapid. Congelarea nu produce pierderi mari de activitate.

Recoltarea sîngelui se face pe heparină. În plasma citratată activitatea LDH este cu 40% mai scăzută decît în ser.

Oxalatul inhibă activitatea LDH.

Interpretare

Dozarea activității LDH este utilă în diagnosticul bolilor de sînge, infarctul miocardic și al bolilor de ficat.

Boli de sînge. Cea mai mare activitate serică LDH a fost observată în cazurile netratate de anemie pernicioasă (valori pînă la 7000 mU/ml). Prin terapia cu vitamina B₁₂ valorile revin la normal înainte de răspunsul reticulocitozei, ceea ce constituie cel

mai sensibil indicator pentru eficacitatea terapiei.

Valori mai mult sau mai puțin ridicate au fost observate în anemia hemolitică acută (valori pînă la 1000 mU/ml), dar în tipurile cronice de obicei nu are loc modificarea activității LDH.

Este indicată determinarea activității LDH în ser pentru a aprecia eficacitatea tratamentului chimioterapic sau radiologic în leucemia acută și mielogenă, deși valoarea diagnostică a LDH în aceste afecțiuni este minoră.

Valori mari ale activității LDH serice au fost întîlnite în mononucleoza infecțioasă.

Infarct miocardic - activitatea LDH serică crește, atîngînd un maxim după 3 - 5 zile (250-800 mU/ml), valori care revin la normal după 10 - 15 zile.

Activitatea LDH, în contrast cu activitatea GOT, rămîne ridicată o perioadă de timp mai lungă, permițînd diagnosticarea și în etapele tîrzii ale bolii.

În anghina pectorală nu are loc o creștere a activității LDH, ceea ce permite diferențierea de infarctul miocardic.

Boli de ficat - creșterea activității LDH în hepatita acută (pînă la 500 mU/ml) este mai moderată în comparație cu creșterea activității GOT și GPT.

Valori extrem de crescute au fost întîlnite în afecțiuni toxice acute ale ficatului (intoxi-

cația cu ciuperci, intoxicația cu tetraclorură de carbon și alți solvenți).

Modificările mici ale activității LDH din bolile cronice de ficat nu sînt practic utilizabile în diagnostic.

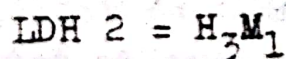
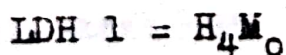
Tumori - creșteri foarte mari ale activității LDH sugerează prezența carcinomului metastazic, în special cu metastază la ficat. Valorile normale ale LDH seric nu exclud existența tumorii.

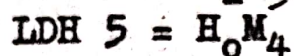
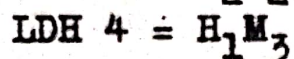
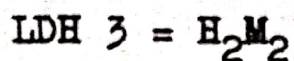
IZOENZIMELE LACTATDEHIDROGENAZEI

Majoritatea enzimelor există în două forme multimoleculare multiple, denumite de Markert izoenzyme care catalizează aceeași reacție dar se deosebesc prin proprietățile fizico - chimice.

Izoenzimele LDH sînt cele mai studiate datorită aplicării lor în diagnostic.

LDH este constituită din două tipuri de subunități polipeptidice notate H (heart) și M (muscle). Prin combinarea acestor unități în grupe de cîte 4, se formează 5 izoenzyme notate de la 1 - 5, repartizate prin migrare electroforetică de la anod la catod, cu următoarele structuri:





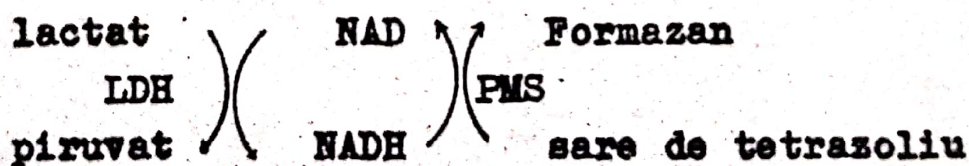
Repartiția acestor izoenzime în țesuturi este diferită. Astfel, LDH 5 care se găsește în cantitate mare în ficat și mușchiul scheletic este aproape absentă în inimă, iar LDH 1 prezentă în cantitate mare în mușchiul inimii, apare sub formă de urme în țesutul hepatic.

Metodele de dozare a izoenzimelor LDH se bazează pe proprietățile fizico-chimice diferite ale acestora: mobilitatea electroforetică, stabilitatea termică, adsorbția selectivă pe DEAE-Celuloză sau DEAE-Sephadex, specificitatea de substrat, inhibiția cu uree, etc.

SEPARAREA IZOENZIMELOR LDH PE GEL DE AGAR

Principiu

Izoenzimele LDH pot fi separate prin electroforeza pe gel de amidon, agar, acetat de celuloză și poliacrilamidă, datorită mobilităților electroforetice diferite. Vizualizarea fracțiunilor se face histoenzimatic:



Fenazin metosulfatul (PMS) este un transportor de electroni, care cuplează reacția LDH cu reacția de transformare a sărurilor de tetrazoliu solubile și incolore în formazan insolubil și colorat care precipită la locul de activitate a LDH.

Reactivi

1. Sol. tampon veronal pH 8,4 ; $\mu = 0,1$.

- Veronal sodic 17 g
- HCl N 13,5 ml
- Apă distilată la 1000 ml

În momentul întrebuintării se diluiază 1:1 cu apă distilată ($\mu = 0,05$).

2. Sol. tampon veronal pH 8,6 ; $\mu = 0,05$

- Veronal sodic 9 g
- HCl N 6,7 ml
- Apă dist. la 1000 ml

3. Gel de agar: Se dizolvă 1,6 g agar Noble-Difco în 100 ml apă distilată, se așteaptă 24 ore pentru a se umfla și apoi se adaugă un volum egal de soluție tampon veronal pH 8,6 ; $\mu = 0,05$ (reactiv 2). După amestecare pH este 8,4 și $\mu = 0,025$. Se încălzește în baie de apă, până devine perfect fluid, se filtrează prin vată și se conservă în eprubete la $+ 4^{\circ} \text{C}$.

În momentul întrebuintării se topește geloza pe baie de apă. Pentru fiecare lamă este necesar 2,5 - 3 ml sol. geloză.

4. Sol. cu lactat de sodiu:

- Lactat de sodiu 0,71 g

- NaCN 50 mg
- Na_2HPO_4 272,2 mg
- Nitroblue tetrazoliu 25 mg

Se dizolvă în ordinea indicată în 90 ml apă distilată.

5. Sol. Fenazinmetosulfat (PMS) 1 mg/ml

6. Sol. NAD sare disodică 1 mg/ml

7. Sol. de fixare:

- Etanol 70 vol.
- Acid acetic 5 vol.
- Apă distilată 25 vol.

Modul de lucru

Pe o lamă de microscop (7,5 cm/2,5 cm), perfect orizontală, se toarnă cu o pipetă 3 ml sol. de agar (lama trebuie să fie bine spălată și degresată cu amestec alcool-eter 1:1). Grosimea de strat realizată este de 1,5 mm. Se așteaptă 30 minute apoi se introduce lama pentru încă 30 minute într-o cameră umedă.

În mijlocul lamei, paralel cu latura mică se taie locașul pentru ser, cu ajutorul unui dreptunghi de hîrtie Whatman nr. 3 (lată de 15 mm). Se introduce hîrtia cu atenție, fără a atinge fundul stratului de gel, lăsînd o peliculă fină de gel la baza șanțului. Șanțul se umple complet cu ser, cu o pipetă efilată, evitînd trecerea peste margini sau umplerea incompletă. Se marchează capătul spre catod.

Se introduc apoi lamele în aparatul de electroforeză (5,5 mA pe lamă) timp de 90 minute.

După separare, lamele sînt incubate 90 minute la 37°C în mediul următor:

- Sol. cu lactat de Na 3,6 mg
- Sol.PMS 0,1 ml
- NAD 4 mg

(amestec necesar pentru o lamă).

După incubare, lamele sînt introduse în baia de spălare, cu apă de robinet și apoi în baia de fixare (alcool-acid acetic). După 30 minute lamele se usucă sub hîrtie de filtru îmbibată cu apă de robinet pentru a extrage sărurile din soluția tampon.

După uscarea se eluiază colorantul fiecărei fracțiuni în cantitate determinată de solvent organic și se citește absorbția optică. Se evaluează distribuția procentuală a activității LDH în cele 5 fracțiuni electroforetice și se raportează la activitatea totală LDH în ser.

Observații

În această tehnică se poate produce subcolorarea sau supracolorarea fracțiunilor, ceea ce conduce la apariția modelelor izoenzimatiche neproporționale.

Supracolorarea se produce atunci cînd activitatea unor fracțiuni este mult mai mare decît a altor fracțiuni.

Subcolorarea poate lăsa unele fracțiuni nedecelate.

Interpretare

- In infarct miocardic (formă cu evoluție obișnuită) crește mult fracțiunea cea mai rapidă corespunzătoare LDH_1 .

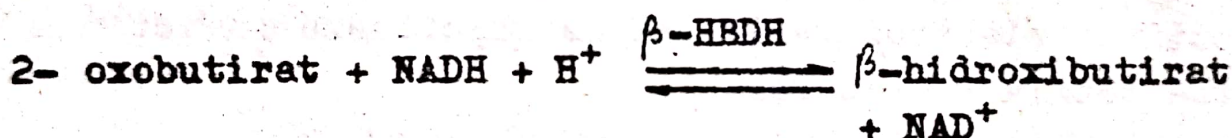
- In icter hemolitic, anemie pernicioasă, cresc izoenzimele LDH_1 și LDH_2 .

- In necroza hepatică și șocul cardiogen crește considerabil LDH_5 , fracțiunea cea mai lentă.

DOZAREA ACTIVITATII IZOENZIMEI LDH_1 (β - hidroxibutirat dehidrogenaza)

Principiu

LDH_1 cunoscută și sub numele de β -hidroxibutirat dehidrogenaza, catalizează reacția:



Oxidarea NADH în această reacție este urmărită prin scăderea absorbției la 340 nm, scădere care este proporțională cu activitatea enzimei.

Reactivi

1. Sol. tampon Tris-maleat 0,2 M, pH 7,4 (sau tampon fosfat M/15 pH 7,4)
2. Sol. NADH 7 mg/ml în NaHCO_3 1%
3. Sol. 2-oxobutirat 10 mg/ml

Modul de lucru

Se procedează la fel ca la dozarea LDH cu

piruvat.

Valori normale

Pînă la 140 mU/ml ser

Interpretare

In serul normal raportul β -HBDH/LDH = 0,62 - 0,82 (LDH/ β -HBDH = 1,21 - 1,61)

Boli de inimă

In 90% din cazurile de infarct cardiac, activitatea β -HBDH a fost crescută la 12 ore de la apariția simptomelor clinice, și atinge valoarea maximă (de 2 - 10 ori valoarea normală) în 48-72 ore.

Revenirea activității β -HBDH are loc treptat, încît la 14 zile de la accident se poate detecta un infarct cardiac cu ajutorul raportului β -HBDH/LDH, care este crescut paralel cu o activitate totală LDH normală.

Revenirea raportului β -HBDH/LDH la valori normale și chiar scăderea lui în timpul infarctului cardiac, indică o insuficiență cardiacă dreaptă cu congestie acută a ficatului sau insuficiență circulatorie.

Raportul β -HBDH/LDH permite diagnosticul diferențial între infarctul miocardic și angina pectorală, fără infarct sau embolie pulmonară, pancreatită sau ulcer perforat, în care valoarea este normală sau scăzută.

Boli de ficat

In afecțiunile acute celulare (hepatite

acute, stress acut în ciroză, intoxicații, congestii acute hepatice) paralel cu activitatea totală LDH crescută, activitatea β -HBDH este crescută deși raportul este scăzut la 0,3.

În bolile cronice de ficat, paralel cu valori ale LDH totale normale sau ușor crescute, raportul este normal sau ușor scăzut.

În metastazele hepatice, activitatea LDH totală și β -HBDH este variabilă (ușor sau puternic crescute), dependentă de participarea parenchimului hepatic la modelul izoenzimatic al LDH din ser.

Boli de sînge

Valori foarte ridicate, paralel cu creșterea raportului β -HBDH/LDH, sînt întîlnite în anemia pernicioasă netratată, anemia hemolitică, leucemia parablasică acută, mai rar în mieloza cronică.

O afecțiune hepatică secundară duce la normalizarea sau scăderea raportului β -HBDH/LDH.

Tumori

Procesele maligne avansate pot produce o creștere a activității β -HBDH în ser aproximativ paralel cu creșterea activității totale LDH.

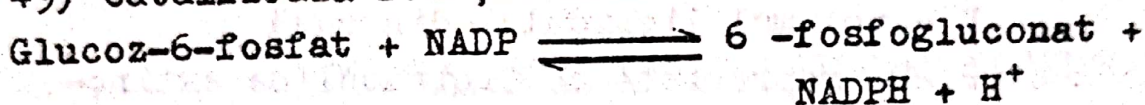
β -HBDH /LDH este normal sau crescut în metastazele hepatice, dar poate fi și scăzut.

DOZAREA ACTIVITATII GLUCOZO-6-FOSFAT
DEHIDROGENAZEI (G₆PDH) IN ERITROCITE
 (Georg Wilhelm L hr  i Hans Dierek Waller)

Principiu

Glucozo-6-fosfatdehidrogenaza (E.C.1.1.1.

49) catalizează reacția următoare:



Se determină activitatea acestei enzime după cantitatea de NADPH format.

NADPH prezintă absorbție la 340 nm  i se urm re te creșterea absorb iei care va fi proporțională cu activitatea G₆PDH.

Reactivi

- 1.Sol.clorură de sodiu 9 gr o
- 2.Sol.tampon Tris 0,2M;pH 7,4
- 3.Sol.glucoz-6-fosfat(sare de sodiu) $3,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ (10 mg la 1 ml apă distilată)
- 4.Sol.NADP (sare de sodiu) 10^{-2}M (7 mg la 1 ml apă bidistilată)

Modul de lucru

In cuva de cuar  a spectrofotometrului cu diametrul de 0,5 cm se introduc:

tampon Tris-maleat pH 7,4	1,8 ml
NADH	0,025ml
hemolizat	0,03 ml

Se citește E₀ (extincția 0), se adaugă

glucoz-6-fosfat 0,1 ml și apoi se citește extincția din minut în minut timp de 5 minute.

Se face media și se află variația extincției pe minut.

Calcul

Se notează:

E = variația extincției / minut

V = volumul lichidului din cuvă

6,22 reprezintă coeficientul de extincție la 340 nm

Dacă 1 μ mol NADPH. 6,22

X $E \times 2 \times V$

$$X = \frac{E \times 2 \times V}{6,22} \text{ } \mu\text{moli NADPH}$$

corespunzător cantității de soluție de analizat din cuvă, adică 0,03 ml hemolizat. Pentru a exprima pe ml de hemolizat se înmulțește cu 33, iar pentru că diluția hemolizatului a fost de 1 la 5, pentru a exprima pe ml de celule se înmulțește cu 6:

$$\mu\text{moli} / \text{ml celule} / \text{minut} = X \times 33 \times 6$$

Valori normale

1,27 - 1,78 unități pe ml

Interpretare

Deficitul în G_6PDH este întâlnit la subiecții de rasă neagră care prezintă o anemie hemolitică declanșată de primachină. Ulterior s-au descris anemii hemolitice la subiecții de rasă albă. Unele medicamente produc anemie prin deficit de G_6PDH (sulfa-

mide, aspirină, cloramfenicol).

Deficitul în G_6PDH se întâlnește și în favism, icter hemolitic neonatal, anemie hemolitică cronică.

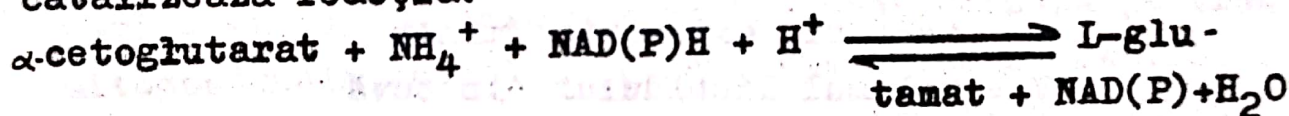
Frecvența acestor tipuri de deficit în G_6PDH este foarte diferită.

DOZAREA ACTIVITĂȚII GLUTAMAT DEHIDROGENAZEI (GLDH) ÎN PLASMA

Principiu

Glutamat dehidrogenaza (E.C. 1.4.1.2.)

catalizează reacția:



Echilibrul reacției este în favoarea formării de acid glutamic și a oxidării NAD(P)H , determinat spectrofotometric la 340 nm. Se urmărește scăderea densității optice $\Delta E/\text{minut}$.

Reactivi

1. Sol. tampon fosfat M/15; pH 8,00
2. Sol. α -cetoglutarat (sare de sodiu) 0,4 M
3. Sol. acetat de amoniu 3 M
4. Sol. EDTA 0,26 M
5. Sol. cisteină 0,02 M

Modul de lucru

Intr-o cuvă de cuarț cu grosimea de strat de 0,5 cm se pipetează:

tampon fosfat pH 8,0	1,64 ml
NADPH	0,03 ml
EDTA	0,02 ml
acetat de amoniu	0,07 ml
hemolizat, plasmă sau omogenat	0,1 ml
cisteină	0,1 ml

Se amestecă cu o baghetă de plastic și se citește E_0 la 340 nm. Se adaugă apoi 0,04 ml soluție α -cetoglutarat, se agită și se citește din minut în minut, timp de 5 minute (extincțiile $E_1 \dots E_5$).

Se face media a trei citiri consecutive și se află variația extincției pe minut.

Calcul

Se notează:

E = variația extincției/minut

V = volumul lichidului din cuvă

6,22 = coeficientul de extincție a NADH la 340 nm.

Dacă 1 μ mol NADH	6,22
X	$E \cdot 2 \cdot V$

$$X = \frac{E \cdot 2 \cdot V}{6,22} \text{ } \mu\text{mol NADH corespun-}$$

zătorii cantității de soluție de analizat din cuvă, adică 0,1 ml. Pentru a avea la ml de plasmă se înmulțește cu 10.

$$\text{ } \mu\text{moli/ml/minut} = X \cdot 10$$

Valori normale

pînă la 0,9 mU/ml plasmă

Interpretare

Determinarea activității GLDH în ser are valoare în diagnosticul bolilor de ficat pentru 2 motive. Pe de o parte conținutul în GLDH în ficat este mai mare decât în alte organe, astfel că GLDH poate fi considerată o enzimă specifică ficatului; pe de altă parte GLDH este prezentă exclusiv în mitocondriile celulelor ficatului. Prin urmare, numai necroza celulelor hepatice cauzează o creștere a activității GLDH în ser. Din cauza aceasta, gradul creșterii activității GLDH în ser este relativ mică chiar în distrugerii severe a celulei hepatice (rar mai mult decât 50 mU/ml), în contrast cu glutamic piruvic transaminaza citoplasmatică și cu glutamic oxalacetic transaminaza parțial mitocondrială. Astfel, deși este specifică ficatului, este nejudicios de a evalua numai activitatea GLDH.

Determinarea simultană a GLDH și a ambelor transaminaze, totuși, are valoare din două motive: pentru evaluarea vitezei necrozei și pentru diagnosticul diferențial al icterului.

În hepatita acută, activitatea GLDH este totdeauna crescută în timpul primelor săptămâni (10-20 mU/ml în medie, valori mai mari în formele necrozante).

Transaminazele, totuși, cresc de 25-50 ori mai mult în bolile difuze ale ficatului, astfel că raportul $\frac{GOT + GPT}{GLDH}$ este mai mare de 50.

GLDH

În cursul hepatitei, GLDH adesea revine la normal într-o săptămână, înaintea transaminazelor. Aceasta o face să nu fie corespunzătoare ca un criteriu pentru aprecierea cursului bolii.

Hepatita cronică și ciroza

În inflamația cronică a ficatului, creșterea activității GLDH este frecvent găsită în ser, chiar numai cu o activitate moderat crescută a transaminazelor.

În timpul unei exacerbări acute, GLDH atinge valori ca și în hepatita acută sau mai mari. Creșterea transaminazelor, totuși, este frecvent mai mică decât în hepatita acută, astfel că raportul $\frac{GOT + GPT}{GLDH}$

atinge valori între 30-40.

Aceasta poate diferenția o hepatită acută de o exacerbare a hepatitei cronice sau o ciroză subclinică.

În timpul comei hepatice, o creștere a activității GLDH în ser cu simultana descreștere a transaminazelor este de un prognostic rău.

Icter obstructiv

În icterul obstructiv, activitatea GLDH este frecvent găsită a fi în același domeniu ca în hepatita acută. Dar întrucât transaminazele sînt în mod obișnuit considerabil mai scăzute decât în hepatita acută, raportul $\frac{GOT + GPT}{GLDH}$ este mai mic de 15

DOZAREA ACTIVITATII CATALAZEI DIN SINGE (Metoda Bach Zubcova)

Principiu

Catalaza din sînge, descompune apa oxigenată cu eliberare de oxigen molecular. Pentru dozarea activității catalazei, se determină cantitatea de apă oxigenată descompusă de catalaza din sînge în 30 minute la 17°C.

Reactivi

1. Sol. perhidrol 1 % (3,3 ml perhidrol la 100 ml apă distilată)
2. Sol. acid sulfuric 10 %
3. Sol. permanganat de potasiu N/10
4. Alcool amilic.

Modul de lucru

Se recoltează din pulpa degetului, cu o micropipetă, 0,1 ml sînge și se introduc într-un balon cotat de 100 ml, care conține 10 ml apă distilată. Se amestecă pentru a se produce hemoliza. Se completează apoi cu apă distilată pînă la semn, obținînd astfel o diluție a sîngelui de 1/1000.

Se iau 4 baloane Erlenmeyer, în care se introduc:

	Probă (ml)		Martor (ml)	
	1	2	3	4
Apă distilată	10	10	10	10
Sînge 1/1000	1	1	1	1

Se fierb baloanele 3 și 4 pentru a distruge activitatea catalazei, după care se răcesc și se adaugă:

Soluție perhidrol	2	2	2	2
-------------------	---	---	---	---

Se agită și se lasă în repaus timp de 30 minute la 17°C.

Acid sulfuric	5	5	5	5
Alcool amilic	2-3pic.	2-3	2-3	2-3

Toate probele se titrează cu permanganat de potasiu N/10 pînă la culoare roz stabilă. Se notează numărul de ml permanganat N/10 folosiți la fiecare balon în parte.

Calcul

Cifra catalazei = $(N - N') \cdot 1,7$

N reprezintă media cantității, în ml, de permanganat de potasiu utilizați la titrarea soluției de perhidrol din martorul 3 și 4, iar N' reprezintă același lucru pentru proba 1 și 2.

1,7 provine: echivalentul gram al apei oxigenate este 17 g. Un ml de permanganat de K N/10 corespunde la 1,7 mg apă oxigenată.

Indicele catalazei = $\frac{\text{cifra catalazei}}{\text{nr. milioane globule roșii}}$

Valori normale

Cifra catalazei = 14 - 18

Observații

Determinarea acțiunii catalazei se face la temperatura de 17°C , deoarece la 37°C este activă proteaza, care distruge catalaza.

Numai indicele catalazei are valoare de diagnostic, deoarece acești indici pot fi comparați între ei.

Interpretare

În afecțiunile hepatice, indicele catalazei este scăzut în 80% din cazuri. De asemenea, întâlnim scăderi în cancer, anemie, cașexie, etc.

DOZAREA ACTIVITATII TRANSAMINAZELOR
DIN SER

(Metoda Reetman și Frenkel)

Principiu

Glutamic oxalacetic transaminaza (E.C.

2.6.1.1) - G.O.T. catalizează reacția:

acid aspartic + acid α -cetoglutaric $\rightarrow$
acid glutamic + acid oxalacetic

Glutamic piruvic transaminaza (E.C.2.6.

1.2) - G.P.T. catalizează reacția:

alanină + acid α -cetoglutaric $\rightarrow$
acid piruvic + acid glutamic

Acidul piruvic și oxalacetic rezultă și formează cu 2,4-dinitrofenilhidrazina, hidrazonile

corespunzătoare, care în mediu alcalin dau o colorație roșie - brună.

Reactivi

1. Sol. tampon fosfat pH 7,4

fosfat disodic	15 g
fosfat monopotasic	1,09 g
apă distilată pînă la	500 ml
2. Sol. etalon de acid piruvic

piruvat de sodiu	1 g %
	0,125 g
tampon fosfat pînă la	100 ml

În momentul întrebuintării, această soluție este diluată cu tamponul fosfat la 1/10 (100, μ g acid piruvic pe ml).

3. Sol. substrat pentru GPT

acid α -cetoglutamic	29,2 mg
DL-alanină	1,78 g

Se dizolvă în tamponul de fosfat, se completează pînă la 100 ml și se verifică ca pH-ul să fie 7,4.

4. Sol. substrat pentru GOT

acid α -cetoglutamic	29,2 mg
acid DL-aspartic	2,66 g

Se dizolvă în soluție NaOH 1N pînă la 20 ml. Se ajustează pH-ul la 7,4 și se completează apoi la 100 ml soluție tampon.

5. Sol. NaOH 1N

6. Sol. HCl 1N

7.Sol. 2,4-dinitrofenil hidrazină

2,4-dinitrofenil hidrazină 19,8 mg

HCl 1 N pînă la 100,0 ml

Se încălzește încet la 60°C, pînă la solvi-
re completă.

8.Sol.NaOH 0,4 N

Modul de lucru

	Probă GOT	Probă GPT	Etalon	Martor
	ml	ml	ml	ml
Substrat GOT	0,5	-	0,4	0,5
Substrat GPT	-	0,5	-	-

Se ține la 37°C timp de cîteva minute
pentru a lua temperatura mediului.

Ser	0,1	0,1	-	-
-----	-----	-----	---	---

Se agită și se ține la 37°C timp de 60 de
minute pentru GOT și 30 de minute pentru GPT.

Etalon	-	-	0,1	-
2,4-dinitrofenil hidrazină	0,5	0,5	0,5	0,5
Ser	-	-	-	0,1

Se agită din nou și se lasă să stea la
temperatura camerei timp de 20 minute

NaOH 0,4 N	5	5	5	5
------------	---	---	---	---

Se agită și se citește extincția probei
GOT și probei GPT și a etalonului față de martor la
440 - 505 nm.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 100 = \text{ug acid piruvic /ml}$$

Pentru a exprima în unități (U), adică $\mu\text{moli/ml/min}$, valoarea obținută se împarte la timpul de incubare (60 minute) pentru GOT și (30 minute) pentru GPT și la 88 care reprezintă echivalentul acidului piruvic.

$$\frac{E_P}{E_E} \times \frac{100}{88 \cdot \text{timp}} = \mu\text{moli/ml/min} = \text{U.I.}$$

$$1 \text{ U.I.} = 1000 \text{ mU}$$

Valori normale

GOT : 10 - 80 unități colorimetrice convenționale ($\mu\text{g acid piruvic/ml}$)

GPT : 5 - 75 unități colorimetrice convenționale

GOT : până la 12 mU / ml

GPT : până la 10 mU/ml

Interpretare

În ultimii ani, determinarea activității GOT în ser a fost utilizată într-o mare măsură pentru diagnosticul și urmărirea evoluției unor afecțiuni hepatice și cardiace.

Determinarea activității GPT este mai limitată deoarece originea sa este aproape exclusiv hepatică.

Hepatita acută: în majoritatea cazurilor se produce o creștere a GOT înaintea de apariția icterului. Valori de 150 - 500 mU/ml fac foarte probabil diagnosticul de hepatită acută, deși trebuie avut în vedere diferențierea față de o fază acută a unei boli hepatice cronice sau de o intoxicație acută. Nu există hepatită acută fără creșterea activității acestor enzime. Activitatea GPT este mai mare decât a GOT în hepatita acută, raportul lui De Ritis ($GOT/GPT = 1,3$ în mod normal) fiind sub 1,3 în acest caz. Când hepatita este de tip anictERIC creșterea activităților enzimatică poate fi singurul semn diagnostic.

Boli hepatice cronice : în majoritatea cazurilor activitatea GOT crește moderat, astfel că trebuie completată cu semnele clinice și alte teste de laborator. În aceste afecțiuni creșterea activității GPT este mică.

Icterul obstructiv: în contrast cu hepatita acută, creșterea activității transaminazelor este mică, nivele mai înalte urmînd colicilor biliare după care scad rapid.

Infarctul miocardic: activitatea GOT crește în 95 % din cazuri ajungînd la maximum în 24 - 48 ore, iar după 4 - 7 zile revine la normal. Valoarea creșterii poate indica extinderea leziunii (50-150 mU/ml). GPT are o activitate scăzută în miocard, dar o creștere la valori mai mari decât a GOT, cîteva zile după infarct indică o insuficiență cardiacă dreaptă.

DOZAREA ACTIVITATII AMILAZEI IN SER SI URINA

(Metoda Wohlgemuth)

Principiu

Se determină cantitatea minimă de amilază capabilă să hidrolizeze o cantitate determinată de amidon. Pentru a pune în evidență amidonul rămas nehidrolizat după 30 minute la 37°C se folosește iodul ca indicator.

Reactivi

1. Sol. NaCl 9 g ‰
2. Sol. iod N/50
3. Sol. amidon 1 g ‰ (preparat extemporaneu)

Modul de lucru

Se iau zece eprubete introducând apoi în fiecare câte 1 ml soluție NaCl .Se adaugă 1 ml ser sau urină proaspătă în prima eprubetă, se agită, se ia din aceasta 1 ml și se trece în a doua, se agită. Se procedează astfel până la ultima eprubetă din care se ia 1 ml și se aruncă, realizând în felul acesta o serie de diluții succesive.

În toate eprubetele se adaugă câte 2 ml soluție amidon, se agită și se pun la termostat la 37°C timp de 30 de minute. Se răcesc apoi și se adaugă la fiecare eprubetă câte 2-3 picături dintr-o soluție de iod N/50.

Eprubetele în care amidonul este complet hidrolizat sînt incolore. Acelea în care hidroliza este

incompletă au o colorație brun roșcată, datorită dextrinelor, iar eprubetele cu soluție albastră conțin amidon nehidrolizat.

Activitatea amilazei, determinată astfel, se exprimă în unități Wohlgemuth.

O unitate Wohlgemuth reprezintă cantitatea minimă de amilază capabilă să hidrolizeze 1 mg de amidon în 30' la 37°C.

Calcul

Nr.eprubetelor	1	2	3	4	5	10
Diluția	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/1024
U.Wohlgemuth	4	8	16	32	64	 2048

Se notează prima eprubetă în care nu s-a produs hidroliza completă a amidonului, deci acelea unde avem o colorație albastră violet.

De exemplu eprubeta nr.5, deci în eprubeta 4 există cantitate suficientă de amilază pentru a hidroliza 2 mg de amidon, adică 2 U.W.

Diluția în eprubeta nr.4 este de 1/16.

Dacă în 1/16 ser sau urină se află 2 UW
în 1 ml..... X

$$X = \frac{1.2}{1/16} = 16.2 = 32$$

Deci unitățile Wohlgemuth (UW) se calculează înmulțind ~~numărătorul~~ fracției, care arată diluția, cu 2. *numitorul*

Valori normale

Amilază ser U.W./ml 16 - 32

Amilază urină U.W./ml 8 - 64

Amilază secreție pancreatică U.W./ml 256 - 2048

DOZAREA AMILAZEI IN SER SI URINA

(Metodă colorimetrică după Richterich)

Principiu

Activitatea amilazei (E.C.3.2.1.1.) este determinată prin măsurarea colorimetrică a cantității de amidon hidrolizat în timp de 30' la 37°C, de o cantitate determinată de ser sau urină.

Reactivi

1.Sol.HCl 0,5 N

2.Sol.Tampon colidină - HCl 50 mM; NaCl 50mM

apă distilată 250 ml

Sol.colidină(25 ml %) 250 ml

HCl 0,5 N 250 ml

NaCl 2,93 g

Se agită pînă la omogenizare, se corectează pH-ul cu HCl pînă la 7,5 și se completează la 1000 ml cu apă distilată.

3.Reactiv cu iod:

KI 108 mM 18 g

I₂ 14 mM 1,8 g

Se dizolvă în puțină apă și apoi se completează la 1000 ml. În momentul întrebuintării se dilu-

iază 1:200 cu apă distilată.

4. Substrat amidon 6,2 mM (1,0044 g %) Se prepară proaspăt. Înainte de lucru se amestecă 1:1 cu tampon.

Modul de lucru

Reactivi	Probă (ml)	Martor (ml)
Sol. tampon-substrat	1	1
HCl 0,5 N	-	0,5
Incubare 5 minute la 37°C		
Ser, urină	0,02	0,02
Incubare 30 minute la 37°C		
HCl 0,5 N	0,5	-
Reactiv Iod (dil.)	10	10

Se citește extincția după 10 - 120 minute la 560 - 620 nm față de apă distilată.

Calcul

$$U.I. = \frac{E_M - E_P}{E_M} \cdot 5166$$

0 unitate internațională reprezintă numărul de μ moli/min/ 1000 ml ser sau urină.

Valori normale

Ser: 230 - 2730 U.I.

Urină: pînă la 8000 U.I.

Observații

Greutatea moleculară a colidinei este 121,8, deci se vor dizolva 26 ml % din care se vor

lua 250 ml pentru tampon.

Deoarece în salivă cantitatea de amilază este de aproximativ 700 ori mai mare decât în ser, se vor face diluții ale salivei de 1/1000 - 1/2000.

Sucul duodenal se va dilua 1/10.

Serul poate fi păstrat la rece timp de 10 zile.

Interpretare

Se pot întâlni valori crescute în:

pancreatite acute, când creșterea amilazei serice atinge valori maxime până la 30 ore de la debut, iar în pancreatita necrotică până la 72 ore, după care urmează evoluția bolii. Revenirea la normal precede uneori atenuarea simptomelor clinice.

În pancreatita cronică, activitatea amilazei este mai puțin semnificativă, fiind mărită în faza de acutizare a bolii și revine la normal după ce episodul acut sau subacut a trecut. În unele contuzii abdominale, existența unei activități crescute denotă și o lezare a pancreasului.

Creșterea amilazei serice este însoțită de o creștere a lipazei și modificări în același sens a amilazei urinare.

Amilaza urinară crește în sindroamele acute cum ar fi ulcer perforat, colici vezicule.

Se mai întâlnesc valori crescute ale activității amilazei în: carcinomul capului de pancreas, obstrucții ale intestinului, oreion, hipertiroidism, la 50 % din pacienții care au făcut tratament cu clorotiazidă și de asemenea după administrare de morfină.

Valori scăzute se întâlnesc: în ciroze, carcinom al ficatului, hepatite, alcoolism.

DOZAREA ACTIVITĂȚII LIPAZEI PANCREATICE (Tehnica Bondi, Chiray și Lebon)

Principiu

Lipaza pancreatică (E.C.3.1.1.3), acționează asupra grăsimilor neutre, pe care le scindează în glicerină și acizi grași. Acizii grași eliberați sînt tratați cu soluție de NaOH N/10 în prezența fenolftaleinei, ca indicator.

Reactivi

1. Sol. NaOH N/10
2. Sol. indicator de fenolftaleină 1%
3. Untdelemn
4. Alcool

Modul de lucru

În următoarele baloane Erlenmeyer se pun:

	Probă	Martor
	ml	ml
Untdelemn	10	10
Lichid duodenal	2	2
Alcool	-	10
Fenolftaleină indicator	-	1-2 pic

Se agită. Martorul este titrat imediat cu soluție NaOH N/10, pînă la apariția unei colorații roz-roșii. Proba este ținută, timp de o oră la 37°C, după

care se adaugă 10 ml alcool, 1-2 picături de fenolftaleină și se titrează cu soluția de NaOH N/10, până la obținerea aceleiași tente cu a martorului.

Calcul

Activitatea lipazei în ml NaOH N/10 = diferența dintre numărul de ml de sol. NaOH N/10 folosiți la probă și martor.

Valori normale

Activitatea lipazei în ml NaOH N/10 = 50-60.

DOZAREA ACTIVITATII TRIPSINEI IN SUCUL PANCREATIC

Principiu

Se dozează, sub acțiunea tripsinei (E.C. 3.4.4.4), cantitatea de acizi aminați eliberați de gelatină, timp de o oră la 37°C.

Acizii aminați se dozează după metoda formol titrării a lui Sørensen.

Reactivi

1. Sol. gelatină neutralizată

Se iau 5 g de gelatină, se taie mărunț și se solvă în 100 ml apă distilată. Se încălzește ușor până la solvire. Se adaugă apoi 2 picături de fenolftaleină și se neutralizează cu soluție NaOH N/10.

2. Sol. formol neutralizat 20%

3. Sol. NaOH N/10

4. Sol. indicator de fenolftaleină 1%

Modul de lucru

Intr-un balon Erlenmeyer se măsoară 25 ml soluție gelatină și se pune la termostaț la 37°C , pînă cînd ia temperatura mediului. Se adaugă apoi 1 ml suc pancreatic, se agită și se introduce din nou la termostaț la 37°C , timp de o oră. Se adaugă apoi 1-2 picături de fenolftaleină și se titrează cu NaOH N/10 , pînă la viraj slab roz. Se adaugă 10 ml soluție formol și se titrează în continuare cu NaOH N/10 , pînă la viraj roz intens.

Se adună numărul de ml utilizați în prima și a doua titrare. Se notează această sumă cu N.

Se dozează apoi cantitatea de aminoacizi liberi din gelatină. Se iau 25 ml soluție gelatină, se adaugă 1-2 picături fenolftaleină și se titrează cu NaOH N/10 pînă la viraj roz. Se adaugă apoi 10 ml formol și se titrează în continuare cu NaOH , pînă la viraj roz intens. Se notează numărul de ml utilizați cu n.

Calcul

N - n reprezintă activitatea triptică a unui ml suc pancreatic.

Valoarea normală

10 ml soluție NaOH N/10

DOZAREA ACTIVITATII UROPEPSINEI

(Metoda Anson, Mirski și Bucher)

Principiu

Uropepsina în mediu slab acid, acționează asupra substratului de hemoglobină cu punerea în libertate a tirozinei. Tirozina în prezența reactivului fosfo-wolframic-sulfat de litium și în mediu alcalin dă o colorație albastră.

Reactivi

1. Substrat de hemoglobină:

Se recoltează o cantitate de sânge pe citrat de sodiu apoi se centrifughează. După îndepărtarea plasmei se adaugă soluție de NaCl 9% pentru spălarea hematiilor. Se agită ușor, se decantează soluția de NaCl, hematiile spălate fiind hemolizate ulterior, cu apă distilată în proporție de două volume apă la un volum hematii. Se determină cantitatea de hemoglobină, după care se face o diluție pentru a se căpăta o concentrație în hemoglobină de 6 %. Această soluție se păstrează la rece.

În momentul întrebuintării se amestecă două volume de substrat de hemoglobină cu trei volume de HCl 1/8 N.

2. Sol. acid tricloracetic 56 %

3. Sol. HCl 1/8 N

4. Sol. HCl 1/10 N

5. Sol. NaOH 1/2 N

6. Reactiv Folin-Ciocalteu:

Intr-un balon cu refrigerent ascendent se introduc:

Tungstat de sodiu	100 g
Molibdat de sodiu	25 g
Apă distilată	700 ml

Se agită pentru solvire

HCl concentrat	100 ml
----------------	--------

Se agită și se lasă să fiarbă sub reflux timp de 10 ore, după care se adaugă:

Sulfat de litiu	150 g
Apă distilată	50 ml

Se agită din nou pînă la solvire completă, se răcește și se adaugă cîteva picături de apă bromată (o picătură de brom la 100 ml apă distilată). Se agită și se îndepărtează excesul de brom prin trecerea unui curent de aer prin soluție sau prin fierberea soluției pînă la dispariția mirosului de brom. Culoarea verde brună a reactivului trece în galben. Se filtrează reactivul după care se completează cu apă distilată pînă la 1000 ml.

După un timp reactivul virează din nou în verde brun. Pentru a fi din nou utilizabil se tratează cu apă bromată.

În momentul întrebuintării se diluiază un volum reactiv Folin-Ciocalteu cu două volume apă distilată.

7. Sol. etalon tirozină în acid sulfuric N, 100 mg%

Soluția de tirozină se diluiază apoi 1/10.

Modul de lucru

In următoarele eprubete de reacție se introduc:

	Proba activă ml	Proba inactivă ml	Etalon ml
Urină	0,2	0,2	-
Substrat Hb	1	1	-
Ac. tricloracetic	-	2	-

Se agită și se introduc timp de 1 oră

la 37°C.

Ac. tricloracetic	2	-	-
-------------------	---	---	---

Se agită și se filtrează

Filtrat	0,4	0,4	-
Etalon tirozină dil.	-	-	0,2
Apă distilată	2,4	2,4	1,8
NaOH 1/2 N	1,6	1,6	1,6
HCl N/10	-	-	0,8
Reactiv F-C.dil.1/3	0,6	0,6	0,6

Se agită și se lasă la temperatura camerei și la întuneric timp de 30 minute. Se citește extincția la 580 nm a celor trei probe față de apă distilată.

Calcul

$$\frac{E_{p.active} - E_{p.inactive}}{E_{etalon}} \times 80 = \text{activitatea}$$

uropepsinei exprimată în mg tirozină la 100 ml urină.

Rezultatul final se raportează la volumul urinii din 24 ore.

Interpretare

Variațiile fiziologice și patologice ale uropepsinei prezintă modificări de la o zi la alta. Oricît ar fi de mari aceste variații, ele nu afectează caracteristica uropeptică a unor afecțiuni.

În linii mari curba uropeptică este paralelă cu aciditatea sucului gastric.

În ulcerul duodenal, este în majoritatea cazurilor, de două trei ori mai mare, în medie, față de normal. În ulcerul gastric valorile sînt asemănătoare sau ușor crescute față de normal. Nu există nici o relație între valoarea uropepsinei și mărimea ulcerului.

Uropepsina nocturnă la bolnavii de ulcer este mai mare decît cea diurnă (invers față de normal)

În perioada de acalmie terapeutică scade în primul rînd uropepsina nocturnă și mai puțin cea totală din 24 ore.

Valoarea uropepsinei în 24 ore și raportul dintre aceasta și secreția nocturnă, pot constitui teste obiective de evolutivitate, în diagnosticul bolii ulceroase.

Rezecția subtotală pentru ulcer, determină o scădere substanțială, uneori pînă la dispariția uropepsinei.

În afecțiunile digestive neulceroase, chiar cu valori hiperacide, uropepsina nu depășește în general normalul.

DOZAREA ACTIVITATII COLINESTERAZEI SERICE
(Metoda Stedman și White)

Principiu

Se dozează titrimetric acidul acetic eliberat sub acțiunea colinesterazei asupra acetilcolinei.

Reactivi

1. Sol. extemporanee de acetil colină 2%
2. Sol. alcalină de roșu de crezol 0,04 g %
3. Sol. NaOH N/100

Modul de lucru

Intr-un balon Erlenmeyer de 25 ml se pun 19 ml apă bidistilată, 1 ml sol. acetilcolină și 2-3 picături roșu de crezol.

Se pune în baie de apă la 38°C. Dacă lichidul ia o culoare violetă înseamnă că există acid acetic eliberat spontan din acetilcolină.

Se lasă să picure din biuretă soluție NaOH N/100 până ce lichidul își schimbă culoarea de la violet spre galben. Se așteaptă 10 minute pentru a vedea dacă nu se schimbă culoarea. După acest timp, se adaugă 1 ml ser și apoi din 5 în 5 minute se titrează cantitatea de acid acetic eliberată din substrat, timp de 20 de minute.

Calcul

Activitatea colinesterazei reprezintă numărul de mililitri de NaOH N/100 folosiți la cele patru titrări succesive, după adăugarea serului.

Valori normale

Activitatea colinesterazei la 1 ml sol. NaOH
N/100 este egal cu 5-8

Interpretare

În unele stări fiziologice cum ar fi a doua jumătate a perioadei de sarcină activitatea colinesterazei este scăzută.

Activitatea colinesterazei scade în hepatitele supraacute, în episoadele grave acute ale cirozei, în cirozele atrofice decompensate și în metastazele hepatice. Activitatea colinesterazei este corelată cu albuminele.

Scăderi ale colinesterazei se întâlnesc în distrofia musculară, miotonia congenitală Thompson, intoxicații cu insecticide organofosforice, în lipsa proteinelor din alimentație și în stările de cașexie tumorală.

Este puternic scăzută în leucemia parablasică acută.

Creșteri ale activității serice a colinesterazei se întâlnesc în stări de adipozitate extremă și în nefroză.

DOZAREA ACTIVITATII FOSFATAZEI ALCALINE DIN SER

Principiu

Fosfataza (E.C.3.1.3.1) catalizează scindarea hidrolitică a esterilor acidului ortofosforic. Se determină cantitatea de fosfor eliberată din β -glicerofosfat de către fosfataza din ser, într-un mediu de tampon de pH 8,6.

Reactivi

1. Sol. inițială de β -glicerofosfat

β -glicerofosfat de sodiu	1,00 g
barbiturat de sodiu (medinal)	0,85 g
apă distilată	30 ml

Se agită. Se încălzește pînă la completa solvire, se răcește. Se completează cu apă distilată la 100 ml.

2. Sol. alcalină de lucru pH 8,6

soluție (1) 50 ml + 2 ml NaOH N/10, apă distilată pînă la 100 ml. Se verifică pH-ul.

3. Sol. acid tricloracetic 10%

4. Sol. acid molibdic

a) sol. molibdat de amoniu	25 g
apă distilată	300 ml
b) sol. acid sulfuric	
apă distilată	125 ml
acid sulfuric conc.	75 ml

După solvirea molibdatului și răcirea soluției de acid sulfuric se amestecă soluțiile (a) și (b)

și se completează la 500 ml cu apă distilată.

5.Sol. acid ascorbic 1% în HCl N/10

6.Sol fosfat acid de potasiu (KH_2PO_4) 0,4394 g%

Din această soluție mamă se iau 25 ml și se completează la 200 ml cu apă distilată. 2 ml din această soluție corespund la 0,025 mg fosfor.

Modul de lucru

In următoarele eprubete de reacție se pipetează:

	Proba activă	Proba inactivă	Etalon
	ml	ml	ml
Substrat (sol.2)	5	5	-
Acid tricloracetic	-	4,5	-
Ser	0,5	0,5	-
Incubare la 37°C timp de 0 oră.			
Acid tricloracetic	4,5	-	-
Se agită și apoi se filtrează.			
Filtrat	5	5	-
Etalon	-	-	2
Acid molidic	2	2	2
Acid ascorbic	2	2	2
Apă distilată	1	1	4

Se agită. Se lasă în repaus la întuneric 30 de minute.

Se citește densitatea optică a etalonului (E), a probei active (A) și a probei inactive (I) la 630 nm.

Calcul

$$\text{Fosfor mg \%} = \frac{E_A - E_I}{E_{\text{etalon}}} \times 0,025 \times 400$$

Valori normale

Unități Bodansky: 1 mgP/oră/100 ml

Adulți: 2-4 unități

Copii: 5-15 unități

Exprimat în mU/ml:

Adulți: 20-40 mU/ml

Copii: 38-138 mU/ml

Transformarea unităților Bodansky în mU/ml
se face înmulțind cu 5,4.

DOZAREA ACTIVITATII FOSFATAZEI ALCALINE
IN SER CU 4-AMINOANTIPIRINA

Principiu.

Fosfatasa alcalină hidrolizează fenilfosfatul de sodiu la pH 10, cu eliberare de fenol. În mediu alcalin, fenolul formează cu 4-aminoantipirina și fericiamara de potasiu un compus de culoare roșie.

Reactivi

1. Tampon carbonat - bicarbonat de sodiu 0,1 M, pH 10

Na_2CO_3 anhidru 3,18 g

NaHCO_3 1,68 g

apă distilată la 500 ml

2. Substrat fenilfosfat disodic 0,01 M

fenilfosfat disodic

0,218 g

apă bidistilată la

100 ml

Se adaugă câteva picături de cloroform și se păstrează câteva zile la 4°C . După acest interval de timp are loc o hidroliză, care afectează sensibilitatea metodei.

3.Sol. NaOH 0,5 N

4.Sol. NaHCO_3 0,5 M - 4,2 g%

5.Sol. 4-amino-antipirină - 0,6 g%

Se păstrează în sticlă brună la $+4^{\circ}\text{C}$.

6.Amestec bicarbonat - 4-amino-antipirină

 NaHCO_3 0,5M

60 ml

4-amino-antipirină

50 ml

Se prepară proaspăt.

7.Sol. fericianură de potasiu 2,4%.

Se păstrează în sticlă brună.

8.Sol. stoc fenol - 1 g% ml HCl N/10

Se păstrează la $+4^{\circ}\text{C}$.

9.Sol. diluată de fenol (0,01 mg/ml)

Se diluiază soluția stoc 1/1000. Se adaugă câteva picături de cloroform și se păstrează la $+4^{\circ}\text{C}$.

Modul de lucru

	Activ	Inactiv	Etalon	Martor
Tampon	0,2	0,2	0,2	0,2
Substrat	0,2	0,2	-	0,2
Apă bidistilată	-	-	-	0,2
Etalon 0,01 mg/ml	-	-	0,2	-

Probele activă și inactivă se țin 5 minute
la 37°C.

	Activ ml	Inactiv ml	Etalon ml	Martor ml
Ser	0,1	-	-	-
Incubare 15' la 37°C				
NaOH 0,5N	0,16	0,16	0,16	0,16
Ser	-	0,1	-	-
Amestec bicarbonat				
4-amino-antipirină	0,44	0,44	0,44	0,44
Fericianură de K	0,2	0,2	0,2	0,2
Apă bidistilată	1,0	1,0	1,0	1,0

Se amestecă după adăugarea fiecărui reactiv, se lasă 10 minute la lumină difuză și se citesc, la 510 nm, densitățile optice pentru probele activ, inactiv etalon față de martor, în cuve de 0,5 cm.

Calcul

$$\frac{E_A - E_I}{E_E} \times 10 = \text{U.K. la 100 ml}$$

1 unitate King-Armstrong (U.K.A.) este cantitatea de enzimă din 100 ml ser care eliberează 1 mg de fenol în 15 minute la 37°C (1 mg fenol/15 minute/100ml)

Pentru a exprima în mU/ml se înmulțește cu 7,1 la 37°C.

Valori normale

Adulți : 5 - 10 U.K.A./100 ml ser

Copii : 10-20 U.K.A./100 ml ser

Sugari : 15-30 U.K.A./100 ml ser

DOZAREA ACTIVITATII FOSFATAZEI ACIDE DIN SER

Principiu

Principiul determinării este același ca și pentru fosfataza alcalină însă substratul care se prepară este acid cu un pH de 4,5 - 4,9.

Reactivi

1. Sol. normală de acid acetic, 60 ml ‰
2. Sol. inițială de -glicerofosfat de sodiu (vezi fosfataza alcalină)
3. Sol. acidă de lucru pH 4,5 - 4,9

Sol(2) 50 ml + 5 ml sol. N acid acetic, apă distilată pînă la 100 ml

4. Reactivii necesari pentru dozarea fosforului (vezi fosfataza alcalină)

Modul de lucru

În următoarele eprubete de reacție se pipetează:

	Proba A	Proba I	Etalon
	ml	ml	ml
Substrat (sol3)	5	5	-
Acid tricloracetic	-	4,5	-
Ser	0,5	0,5	-
Incubare la 37°C o oră			
Acid tricloracetic	4,5	-	-
Se agită, se filtrează			
Filtrat	5	5	-
Etalon	-	-	2

Acid molidic	2	2	2
Acid ascorbic	2	2	2
Apă distilată	1	1	4

Se agită, se lasă în repus la întuneric 30 de minute.

Se citește densitatea optică a etalomului (E), a probei active (A) și a probei inactive (I) la 630 nm.

Calcul

$$\frac{E_A - E_I}{E_E} \times 0,025 \times 400 = \text{mg \% fosfor}$$

Unități Bodansky

Adult: 0,05 - 0,10

Copil: 0,20 - 0,80

Interpretare

Bolile și perturbările funcționale ale osului rămân încă principala aplicare a fosfatazei alcaline.

Fosfataza alcalină este originară din osteoblaștii osului (și parțial din osteoclaști). Din os ea trece în plasmă și este excretată prin bilă. Prin urmare, în absența bolilor hepatobiliare schimbările în valoarea enzimei în ser sînt în directă legătură cu activitatea osteoblaștilor.

În timpul copilăriei, fosfataza alcalină din ser corespunde cu viteza de creștere a osului.

Există o creștere a activității enzimei în ser în unele boli implicând creșterea activității osteoblaștilor.

Creșterea fosfatazei alcaline este singura schimbare chimică caracteristică bolii Paget în care Ca^{++} seric și fosforul anorganic rămân în limite normale. Valori de 140 - 400 - 800 mU/ml pînă la 1400 mU/ml s-au găsit în diferite stadii ale bolii.

Un ajutor în diagnosticul diferențial al carcinomului de prostată cu metastază în care se găsește o creștere a activității fosfatazei alcaline este asigurată prin determinarea simultană a fosfatazei acide care arată o activitate înaltă în carcinom cu metastază a prostatei, dar numai o ușoară creștere în boala Paget.

Creșterea activității fosfatazei alcaline (150 - 1000 mU/ml) este considerată a fi cel mai sensibil și sigur criteriu a rahitismului. La mai mult de o lună și jumătate înainte ca boala să se manifeste clinic, se poate detecta o creștere a fosfatazei alcaline în ser.

Inceperea scăderii nivelului enzimei din ser după tratamentul cu vitamina D este o indicație a începerii procesului de vindecare.

În hiperparatiroidism nivelul fosfatazei alcaline poate crește pînă la 500 mU/ml, dar nu înainte de a se produce schimbări extensive la nivelul scheletului.

Deși valoarea medie a fosfatazei alcaline

În acest caz este mai mică decât în boala Paget, diagnosticul diferențial este mai ales dependent de hipercalcemia și hipofosfatemia găsită în hiperparatiroidism.

Fosfataza alcalină treptat revine la normal după îndepărtarea chirurgicală a adenomului paratiroidian.

Activitatea fosfatazei alcaline este în jurul limitei superioare a normalului în timpul regenerării după fracturi osoase și numai ocazional este ușor crescută.

Valori normale se găsesc de asemenea în osteoporoză; în astfel de cazuri o creștere netă indică o asociere a osteomalaciei.

În cazul tumorilor osoase, o activitate fosfatazică înaltă s-a găsit în special în osteosarcom (o creștere de 20 - 40 ori față de normal) și de asemenea în carcinomul de prostată cu metastază osoasă.

Valori normale se găsesc în tumori benigne ale scheletului.

O creștere a activității fosfatazei alcaline în ser, în prezența unei tumori maligne, poate fi privită ca un semn sigur a unei metastaze osoase, cu condiția ca o metastază la ficat să fie exclusă.

Boli ale sistemului hepato - biliar

O creștere a fosfatazei alcaline din ser se poate produce în obstrucții biliare. Gradul obstrucției intrahepatice biliare, care însoțește alterarea

parenchimului hepatic, poate fi apreciat prin măsurarea simultană a transaminazei și a fosfatazei alcaline.

Cea mai frecventă aplicare a determinării fosfatazei alcaline este în icterele obstructive, când creșterea marcată este în contrast cu creșterea ușoară a transaminazei.

Creșterea persistentă a activității fosfatazei alcaline este de asemenea observată în bolile cu metastază a ficatului.

Fosfataza acidă

Fosfataza acidă din ser este provenită din surse: splină, rinichi, eritrocite și trombocite.

Porțiunea prostatică este mică la indivizii normali. Activitatea fosfatazei acide prostatice poate fi specific inhibată prin adăugarea de L - tartrat la amestecul de reacție, dând astfel posibilitatea de a diferenția diferitele tipuri de fosfatază acidă.

Carcinomul de prostată

O creștere moderată în activitatea fosfatazei acide sugerează prezența unui carcinom de prostată. Totuși, acest indicator nu este atât de sensibil. O creștere semnificativă a nivelului fosfatazei acide este de obicei găsită numai în carcinomul de prostată cu metastază.

Boli neprostatice.

Boala Paget și metastazele la os și ficat din carcinomul de sân cauzează o creștere semnificativă a activității fosfatazei acide.

DOZAREA ACTIVITATII AIDOLAZEI IN SER

Principiu

Aldolaza (Fructozo - 1,6 - difosfat - aldolaza - E.C. 4.1.2.7) catalizează reacția de scindare a fructozo-1,6-difosfatului în două triozfosfați

$$\text{Fructozo-1,6-difosfat} \longrightarrow \text{Dihidroxiacetonfosfat} + \text{D-glicerinaldehid fosfat.}$$

Sulfatul de hidrazină introdus în mediul de reacție, împiedică transformarea triozfosfaților de către alte enzime existente în ser. Triozfosfații sînt hidrolizați în mediul alcalin, iar triozele astfel eliberate reacționează cu 2,4-dinitrofenilhidrazina cu formarea de hidrazone colorate în roșu-brun.

Reactivi

1. Sol. tampon colidină

colidină 1,3 ml

HCl pînă la pH 7,4

Apă dist. la 100 ml

In locul colidinei se poate utiliza piri-dină pură(1 ml %. Se ajustează la pH 7,4 cu NaOH 0,75 N).

2. Sol.Sulfat de hidrazină

Sulfat de hidrazină 7,3 g

NaOH 0,75 N 70 -80 ml(pînă la pH 7,4

Apă distilată la 100 ml

3. Sol.Acid monoiodacetic M/500

Acid monoiodacetic 0,037 g

- Apă distilată 50 ml
 NaOH 0,75 N pînă la pH 7,4
 Apă distilată pînă la 100 ml
4. Sol. 2,4 - dinitrofenil hidrazină 0,1 g
 2,4 - dinitrofenil hidrazină
 HCl 2N (20 ml HCl conc. + 80 ml apă dist.) 100 ml
5. Sol. fructozo-1,6-difosfat de Na 0,02 M
- Intr-o eprubetă de centrifugă se introduc 270 mg fructozo-1,6-difosfat de Na, se dizolvă în 5 ml HCl 1 N. Se adaugă 3,5 ml soluție sulfat de sodiu 1 M, se centrifughează și supernatantul se controlează prin adăugarea unei picături de sulfat de sodiu. După depunerea totală a bariului. supernatantul este trecut într-un balon cotat de 25 ml. Se alcalinizează cu NaOH 0,75 N pînă la pH 7,4 și se completează la semn cu apă distilată. Soluția se păstrează la +4°C, cu cîteva picături de toluol, timp de 2 - 3 săptămîni.
6. Sol. acid tricloracetic 10 g %
7. Sol. NaOH 0,75 N

Modul de lucru

Reactivi	Proba A	Proba I.
	ml	ml
Ser	0,5	0,5
Tampon	0,5	0,5
Amestec sulfat de hidrazină, acid monoiodacetic, apă dist (1:1:1)	0,4	0,4
Fructozo-1,6-difosfat	0,125	-

Incubare o oră la 37° C

Ac. tricloracetic	1,5	1,5
F-1,6-DP	-	0,125

Se lasă în repaus 10 minute, se centrifughează sau se filtrează.

În alte eprubete se introduc:

Filtrat	1	1
NaOH	1	1

Se lasă 10 minute la temp. camerei

2,4-DNPH	1	1
----------	---	---

10 minute la 37° C

NaOH	7	7
------	---	---

După 10 minute se citește extincția probei active (A) și inactive (I), față de apă distilată, la 530nm în cuva de 1 cm.

Calcul

$$(E_A - E_I) \cdot 100 = \text{cifra aldolazei.}$$

Valori normale

Ser: 3 - 15

Interpretare.

Deoarece cea mai mare cantitate de aldolază se găsește în mușchiul scheletic, determinarea ei are importanță particulară în diagnosticul bolilor musculare.

Boli musculare

În crizele acute mioglobinurice, aldolaza serică crește la 100 ori valoarea normală și scăderea treptată a activității poate fi un indicator al

remisiunii.

Distrofia musculară progresivă

În această afecțiune are loc o creștere a activității aldolazei din ser, ajungând uneori la valori de zece ori mai mari decât cea normală, în timp ce activitatea enzimei din mușchi scade la $1/3$ din valoarea inițială. Creșterea activității din ser este mai pronunțată la începutul bolii, deseori chiar înaintea apariției simptomelor clinice.

O creștere marcată a activității aldolazei serice se întâlnește în dermato-miozite.

Infarct cardiac

O creștere a activității aldolazei serice are loc în primele 12 ore de la accident și revine la normal mai încet decât creatin-fosfokinaza (CKP) și GOT, permițând confirmarea diagnosticului și la câteva zile de la episodul acut.

Boli de ficat

În hepatita acută are loc o creștere marcantă a activității aldolazei serice (chiar pînă la o valoare de 10 ori mai mare față de cea normală).

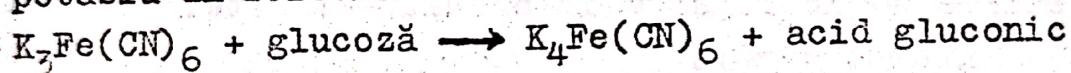
În ciroza hepatică sau obstrucția căilor biliare nu se produce o creștere a activității aldolazei serice.

G L U C I D E

DOZAREA GLUCOZEI IN SINGE
(Metoda Hagedorn - Jensen)

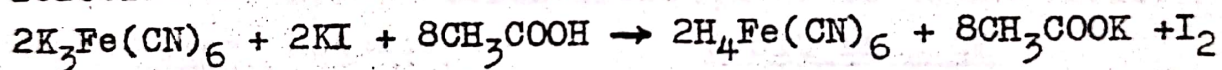
Principiu

Glucosa reduce cantitativ fericianura de potasiu în ferocianură:

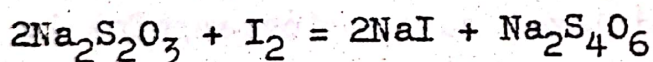


Ferocianura astfel rezultată se precipită cu $ZnSO_4$ pentru a nu disocia înapoi în fericianură.

Excesul de fericianură care nu a fost redus de glucoză, tratat cu KI și acid acetic, este redus în ferocianură cu eliberare cantitativă de iod.



Iodul rămas liber se titrează cu tiosulfat:

Reactivi

1. Sol. NaOH N/10
2. Sol. sulfat de zinc 0,43 g %
3. Sol. acid acetic 2 %
4. Sol. fericianură de potasiu N/200

fericianură de potasiu	1,65 g
carbonat de sodiu anhidru	10,60 g
apă distilată pînă la	1000 ml

In lipsă de carbonat de sodiu anhidru, se poate utiliza carbonat de sodiu cristalizat în cantitate de 28,6 g.

5. Sol. iodo-zincică

Iodură de potasiu	2,5 g
Sulfat de zinc	5 g
Clorură de sodiu	25 g
Apă distilată pînă la	100 ml

6. Sol. amidon indicator

Se solvă 27 g NaCl și se încălzește pînă la fierbere. Se adaugă 1 g amidon antrenat cu 5 ml apă distilată rece. Se continuă fierberea pînă la clarificare. Se răcește. Se filtrează și se completează cu apă distilată la 100 ml.

7. Sol. iodat de potasiu N/200

Se solvă 0,3566 g în 2000 ml apă distilată

8. Sol. tiosulfat de sodiu N/200

9. Florură de sodiu pentru recoltarea sîngelui

Modul de lucru

In trei eprubete se pipetează:

	Proba 1	Proba 2	Martor cald
	ml	ml	ml
Sulfat de zinc	5	5	5
Hidroxid de sodiu	1	1	1
Sînge total	0,1	0,1	-

Se țin eprubetele 3 minute în baia de apă, din momentul în care apa începe să fiarbă. Se filtrează cantitativ prin vată conținutul celor 3 eprubete în

eprubete de tip Hagedorn, după care se adaugă:

Fericianură de potasiu	2	2	2
------------------------	---	---	---

Se pune din nou eprubetele la baia de apă care fierbe, timp de 15 minute. Se răcesc, apoi se adaugă:

Iodo-zincică	3	3	3
Acid acetic	2	2	2
Amidon (picături)	3	3	3

Se titrează iodul rezultat cu tiosulfat de sodiu N/200 până la decolorare. Dacă soluția de tiosulfat de sodiu nu este exact N/200, se determină factorul de corecție (martorul rece).

Intr-o eprubetă se pipetează:

Iodat de potasiu	2 ml
Iodo-zincică	3 ml
Acid acetic	2 ml

Se titrează cu tiosulfat de sodiu până la galben pai, apoi se adaugă 2-3 picături de amidon și se continuă titrarea până la decolorare.

Dacă soluția este exact N/200 se utilizează până la decolorare 2 ml tiosulfat; dacă nu, determinăm factorul de corecție după formula:

$$F = \frac{2}{n}$$

în care n = numărul de ml de tiosulfat de sodiu întrebuințați.

Cu acest factor vom înmulți numărul de ml tiosulfat utilizați la titrarea probelor și a marto-

ului cald pentru a avea tiosulfat de sodiu exact N/200, pentru a putea folosi la calcul tabelul Hagedorn - Jensen.

Calcul

Se face media aritmetică a numărului de ml de tiosulfat folosiți la titrarea probelor cu sînge. Se înmulțește numărul de ml de tiosulfat de sodiu, rezultați din media probelor, cît și numărul de ml de tiosulfat de sodiu al martorului alb cu factorul F. Se citește cantitatea de glucoză din tabel, corespunzătoare în g % atît pentru martorul alb, cît și pentru media probelor cu sînge.

Citirea în tabel se face astfel: prima coloană verticală indică cantitatea de tiosulfat de sodiu în ml, iar prima coloană orizontală, sutimi de ml utilizați. În celelalte coloane verticale este indicată cantitatea de glucoză corespunzătoare în g %.

Rezultatul obținut prin scăderea cantității de glucoză, corespunzătoare martorului alb, din cea a sîngelui, ne indică cantitatea de glucoză în g %.

Valori normale: $1 \pm 0,1$ g glucoză % ml sînge.

Observații

Martorul alb este necesar pentru a cunoaște cantitatea de fericiamură redusă de însăși reactivii folosiți în reacție.

Diferența la titrare dintre cele două probe cu sînge nu trebuie să depășească 0,05 ml tiosulfat de sodiu.

ml tiiosulfat N/200 = grame Glucozã %

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	3,85	3,82	3,79	3,76	3,73	3,70	3,67	3,64	3,61	3,58
0,1	3,55	3,52	3,50	3,48	3,45	3,43	3,41	3,38	3,36	3,33
0,2	3,31	3,29	3,27	3,25	3,23	3,21	3,18	3,16	3,14	3,12
0,3	3,10	3,08	3,06	3,04	3,02	3,00	2,98	2,96	2,94	2,92
0,4	2,90	2,88	2,86	2,84	2,82	2,80	2,78	2,76	2,74	2,72
0,5	2,70	2,68	2,66	2,64	2,62	2,60	2,59	2,57	2,55	2,53
0,6	2,51	2,49	2,47	2,45	2,43	2,41	2,40	2,38	2,36	2,34
0,7	2,32	2,30	2,28	2,26	2,24	2,22	2,21	2,19	2,17	2,15
0,8	2,13	2,11	2,09	2,08	2,06	2,04	2,02	2,00	1,99	1,97
0,9	1,95	1,93	1,91	1,90	1,88	1,86	1,84	1,82	1,81	1,79

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1,0	1,77	1,75	1,73	1,72	1,70	1,68	1,66	1,64	1,63	1,61
1,1	1,59	1,57	1,55	1,54	1,52	1,50	1,48	1,46	1,45	1,43
1,2	1,41	1,39	1,38	1,36	1,34	1,32	1,31	1,29	1,27	1,25
1,3	1,24	1,22	1,20	1,19	1,17	1,15	1,13	1,11	1,10	1,08
1,4	1,06	1,04	1,02	1,01	0,99	0,97	0,95	0,93	0,92	0,90
1,5	0,88	0,87	0,84	0,83	0,81	0,79	0,77	0,75	0,74	0,72
1,6	0,70	0,68	0,66	0,65	0,63	0,61	0,59	0,57	0,56	0,54
1,7	0,52	0,50	0,48	0,47	0,45	0,43	0,41	0,39	0,38	0,36
1,8	0,34	0,32	0,31	0,29	0,27	0,25	0,24	0,22	0,20	0,19
1,9	0,17	0,15	0,14	0,12	0,10	0,08	0,07	0,05	0,03	0,02



- 



supernatant se pipetează în eprubete cu dop

supernatant	0,5	-	-
o-toluidină	4,5	4,5	4,5

Se astupă, se fierbe 10 minute la baia de apă, se răcesc și se citesc extincțiile probei și etalonului față de martor la 570 - 720 nm, cuva de 1 cm.

Fără deproteinizare

	Proba	Etalon	Martor
	ml	ml	ml
Plasmă, LCR, urină	0,1	-	-
etalon diluat 1/10	-	0,1	-
o-toluidină	2	2	2

Se astupă eprubetele, se agită, se lasă în repaus 10 minute și se citește extincția probei și a etalonului în condițiile de mai sus.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 1 = \text{g glucoză \%}$$

Valori normale

Ser: 0,70 - 0,90 g % cu deproteinizare.

0,75 - 1 g% fără deproteinizare.

DOZAREA GLUCIDELOR URINARE (Metoda Ionescu - Matiu)

Principiu

Glucosa, în mediu alcalin reduce cantitativ fericianura de potasiu la ferocianură. Sfârșitul reacției este indicat de acidul picric care este redus la acid picramic de culoare roșie.

Reactivi

1. Sol. acid picric 1 %
2. Sol. etalon glucoză 5 ‰
3. Reactiv fericianic:

Sol. A fericianură de K	48 g
apă distilată	400 ml
Sol. B NaOH	48 g
apă distilată	400 ml

Se amestecă soluțiile A și B și se completează cu apă distilată la 1000 ml.

4. Reactiv Courtonne:

acetat bazic de plumb 300 g ‰

După solvire se adaugă acid acetic glacial pînă la reacție neutră.

Modul de lucru

Fiziologic, prin urină nu se elimină glucoză, din care cauză se cercetează mai întîi prezența ei printr-o reacție de recunoaștere: Benedict, Fehling, etc (vezi analiza de urină).

Dacă reacția este pozitivă se trece la dozarea glucozei.

Se determină densitatea urinei cu ajutorul unui urodensimetru.

Se defecă urina cu reactiv Courtonne: la 9 ml urină se adaugă 1 ml reactiv Courtonne, se agită și se filtrează. Filtratul este utilizat pentru dozarea glucozei, diluându-se după cum urmează, în funcție de densitatea urinei nedefecate:

Densitate	Diluție
1015 - 1017	-
1020	1/2
1025	1/5
1030	1/10

În două baloane Erlenmeyer de 100 ml se introduc:

	Probă	Etalon
	ml	ml
Apă distilată	40	40
Reactiv fericianic	10	10
Acid picric	10 pic.	10 pic

Baloanele se încălzesc direct pe sita de azbest la flacăra unui bec de gaz și la fierbere se titrează: proba cu filtrat, iar etalonul cu soluție etalon de glucoză. Se notează numărul de ml de soluție etalon glucoză utilizați cu N, iar numărul de ml de filtrat cu n.

Calcul

Pentru reducerea fericianurii din 10 ml reactiv fericianic sînt necesari N ml sol. etalon

glucoză sau n ml filtrat, ceea ce înseamnă că în N ml sol. etalon se găsește aceeași cantitate de glucoză, cantitate ce poate fi calculată astfel:

$$\begin{array}{r} 1000 \text{ ml sol. etalon} \quad 5 \text{ g} \\ N \text{ ml} \quad x \\ \hline x = \frac{5N}{1000} = \text{g glucoză în } n \text{ ml filtrat} \end{array}$$

În 1000 ml filtrat vor exista $5N/n$ g glucoză în care N/n este factorul reactivului ferri-cianic.

Pentru a afla cantitatea de glucoză din 1000 ml urină, la rezultatul obținut se adaugă $1/10$ din valoarea lui din cauza diluției intervenită prin defecare.

Dacă urina a fost diluată, se înmulțește rezultatul cu diluția.

Observații

Este necesară defecarea deoarece urina conține și alți compuși reducători (acid uric, creatinină, acid ascorbic, proteine, nucleoproteine, acid glicuronic și glicuronoconjugați ai unor medicamente ca penicilina, dihidrostreptomycină, PAS, acid salicilic, aspirină, piramidon, antipirină, etc) care pot da reacția fals pozitivă.

DOZAREA POLARIMETRICA A GLUCOZEI IN URINA

Principiu

Glucidele (pentozele și hexozele), datorită prezenței atomilor de carbon asimetrici în moleculă, deviază planul luminii polarizate cu un unghi a cărui mărime este direct proporțională cu concentrația, lungimea tubului polarimetrului și unghiul de deviere specific fiecărei oze.

Reactivi

1. Reactiv Courtonne

acetat bazic de plumb

300 g%o

După dizolvarea completă se adaugă acid acetic glacial pînă la reacție neutră.

Modul de lucru

Se defecă urina cu reactiv Courtonne (9 ml urină + 1 ml reactiv Courtonne) și se filtrează. Se umple tubul polarimetrului cu filtrat în așa fel ca în tub să nu rămînă bule de aer. Se citește apoi unghiul de deviere la polarimetru.

Calcul

$$\alpha = \alpha_D \times l \times c$$

α = unghiul citit la polarimetru

D = unghiul de deviere specifică a glucozei

(+52,6)

l = lungimea tubului (dm)

c = concentrația

$$c = \frac{\alpha}{\alpha_{D.1}} = \text{g glucoză în cantitatea de}$$

filtrat din tub. La rezultat se adaugă 1/10 din valoarea lui, din cauza diluției de la defecare.

Rezultatul se raportează la 1000 ml urină.

Interpretare

Determinarea cantitativă a glucozei sanguine, reprezintă cea mai importantă metodă pentru studiul metabolismului glucidic.

Variațiile fiziologice ale glicemiei se pot manifesta prin hipoglicemie, ca în inaniție și prin hiperglicemie ca în excesul de încărcare a organismului cu glucide (hiperglicemia alimentară).

Hiperglicemii patologice întâlnim în infecții, intoxicații cu oxid de carbon, cafeină, accidente cerebrovasculare și în special în diabet. În această boală determinarea glicemiei este în general folosită și ca un indicator al eficacității terapeutice cât și pentru urmărirea evoluției bolii.

Hipoglicemii patologice pot fi întâlnite după administrare de doze prea mari de insulină sau în carcinomul insulelor lui Langerhans.

Stările de hipoglicemie determină apariția de diferite accidente ca: indispoziții, amețeli, somnolență, tahicardie, cefalee.

În general, hipoglicemia între 0,75 - 0,65 g % dă accidente ușoare, între 0,65 - 0,50 accidente

medii iar sub 0,50 g %o tulburări grave cu comă.

Glicozuria

În urina normală se elimină zilnic o cantitate de zaharuri reducătoare care nu depășește 50 mg și nu influențează metodele biochimice obișnuite de decelare.

Unele substanțe reducătoare prezente în urină pot da reacții fals pozitive, de obicei slabe, de aceea, decelarea unor cantități crescute de substanțe reducătoare în urină indică de cele mai multe ori prezența glucozei.

Glicozuria poate indica un diabet renal simplu, o nefropatie dobândită (glomerulonefrită, nefroscleroză, sau nefroză) o nefropatie congenitală (sindromul Toni-Debré-Fanconi). Glicozuriile renale sînt caracterizate prin scăderea pragului renal de eliminare, iar glicemia și curba de hiperglicemie pot fi normale.

Cel mai adesea însă, glicozuriile se datoresc depășirii capacității maxime de resorbție tubulară a glucozei din cauza hiperglicemiei (1,7 g %o). Această tulburare poate fi tranzitorie sau permanentă.

Dintre glicozuriile tranzitorii pot fi menționate cele postprandiale (extrem de rare), gravidice (15-25% din gravide prezintă o glicozurie ușoară în ultimul trimestru de sarcină), precum și cele care însoțesc agresiunile violente (traumatismele, intervenții chirurgicale, infecții acute, pancreatonecroze

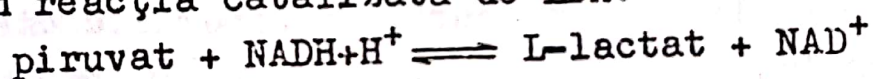
grave, infarct miocardic, leziuni cerebrale, diverse intoxicații, etc.).

Glicozuriile permanente sînt determinate de hiperfuncția unor glande endocrine aparținînd sistemului hiperglicemiant (antehipofiza, suprarenalele, tiroida) dar mai ales a insuficienței insulinice severe caracteristică diabetului zaharat manifest. Glicozuria diabetică, deși consecință a hiperglicemiei, nu depinde exclusiv de acest factor și de aceea nu se poate stabili o relație matematică între nivelul hiperglicemiei și cantitatea de glucoză eliminată zilnic în urină.

DETERMINAREA ENZIMATICA A PIRUVATULUI

Principiu

Piruvatul este redus la L-lactat de către NADH în reacția catalizată de LDH:



Echilibrul reacției este deplasat spre formarea de lactat și NAD^+ . Cantitatea de NADH consumat în reacție este echivalentă cu cantitatea de piruvat ce poate fi determinată prin măsurarea scăderii absorbției la 340 nm.

Reactivi

1. Acid percloric 6%

Acid percloric 70% (D= 1,67)

5 ml

Apă distilată pînă la

100 ml

2. Sol. fosfat bipotasic 1,1 M

Fosfat bipotasic

4,78 g

Apă distilată

25 ml

3. Sol. lactat dehidrogenază

LDH

0,02 ml

Sulfat de amoniu 2,4 M

0,18 ml

4. Sol. NADH 7 mg/ml în NaHCO_3 1 %

5. Sol. NaCl 9 g %

Modul de lucru

La 3 ml sînge total proaspăt recoltat se adaugă 2 ml soluție NaCl și 4 ml acid percloric, se agită și se lasă în gheață 5 minute și apoi se centrifughează la 3000 t/m timp de 10 minute.

La 3 ml supernatant se adaugă 2 ml soluție fosfat bipotasic (se formează un precipitat de perclorat de potasiu și soluția se tamponează la pH 7). Se centrifughează 3 minute la 6000 ture pe minut. Supernatantul este utilizat pentru dozarea spectrofotometrică.

În cuva de cuarț cu diametrul de 0,5 cm a spectrofotometrului se introduc:

supernatant

2 ml

NADH

0,03 ml

Se agită și se citește la 340 nm E_1 față de apa distilată. Se adaugă 0,01 ml soluție LDH se agită și se citește extincția pînă se consumă tot piruvatul - E_2 (Extincția nu mai scade)

Calcul

Se notează:

$$E = E_1 - E_2$$

V = volumul lichidului din cuvă

6,22 = coeficientul de extincție molară a NADH la 340 nm

$$\frac{E \times 2 \times V}{6,22} = \text{mg acid piruvic corespunzător la}$$

0,4 ml sînge conținut în 2 ml supernatant introdus în cuvă.

Pentru a exprima la 100 ml sînge se înmulțește cu 250.

Valori normale

0,4 - 0,6 mg %

Observații

Se recomandă ca recoltarea sîngelui să se facă fără utilizarea garoului și se procedează imediat la deproteinizarea rapidă, dacă este posibil chiar în momentul recoltării.

Se poate face recoltarea pe heparină cu condiția ca deproteinizarea să se facă în primele 15 minute de la recoltare.

DOZAREA COLORIMETRICA A ACIDULUI PIRUVIC

Principiu

Acidul piruvic formează cu 2,4-dinitrofenil-hidrazina în mediu alcalin un compus colorat roșu-brun.

Reactivi

1. Sol. acid tricloracetic 20 g %
2. Sol. 2,4-dinitrofenil-hidrazină 0,1 g % în HCl 2N
3. Toluen
4. Sol. carbonat de sodiu 10 g %
5. Sol. hidroxid de sodiu 2 N
6. Sol. etalon acid piruvic 0,5 mg %

Modul de lucru

La 4 ml sînge proaspăt recoltat se adaugă 4 ml acid tricloracetic, se agită și se lasă în repaus 5 minute după care se filtrează prin hîrtie cantitativă sau se centrifughează. Din supernatant se iau 3 ml și se introduc într-o pîlnie de separare tip Grigaut, se adaugă 1 ml soluție 2,4-dinitrofenil-hidrazină, se lasă în repaus 5 minute, se adaugă 4 ml tolueen, se agită și se lasă în repaus pînă la separarea a două straturi.

Stratul inferior apos, se colectează pe la partea inferioară a pîlniei și este utilizat pentru o nouă extracție, iar stratul superior tolueenic se transvazează pe la partea superioară într-o altă

eprubetă. Se repetă operația de extracție cu încă 2 ml toluen care se adaugă peste extractul apos de la extracția precedentă. Stratul apos de la a doua extracție se aruncă, iar peste stratul tolueenic rămas în pîlnie se introduce extractul tolueenic de la prima separare, se adaugă 2 ml soluție carbonat de sodiu, se agită, se lasă în repaus pentru separarea a două straturi. Stratul apos de carbonat se colectează într-o eprubetă iar peste stratul tolueenic rămas în pîlnie se mai adaugă 2 ml soluție de carbonat și se face o nouă extracție. Se colectează stratul apos peste stratul de carbonat de la extracția precedentă, se adaugă 4 ml hidroxid de sodiu, se agită și se lasă în repaus 10 minute.

Paralel se face o probă etalon: peste 1,5 ml soluție etalon de piruvat se adaugă 1 ml soluție 2,4-dinitrofenil-hidrazină, se lasă în repaus 5 minute, se adaugă 2,5 ml carbonat de sodiu și 4 ml hidroxid de sodiu 2 N. Se agită și se lasă în repaus 10 minute.

Se citesc probele față de apă distilată la 530 nm.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 0,5 = \text{mg acid piruvic la 100 ml sînge}$$

Valori normale: 0,4 - 0,75 mg %

Observații

Sîngele se recoltează pe oxalat (20 mg oxalat de potasiu la 5 ml sînge) pentru a inhiba

activitatea LDH.

Determinarea se face imediat după recoltare.

Interpretare

Cantitatea de acid piruvic din sânge crește în cazul unui deficit de cocarboxilază, a cărei grupare activă este vitamina B₁, din alimentație.

Dozarea acidului piruvic este indicată în explorarea capacității ficatului de a utiliza vitamina B₁.

Prin administrarea de vitamină B₁, la un subiect normal, piruvatul sanguin scade. În cazul unei insuficiențe hepatice, scăderea piruvatului sanguin după administrarea vitaminei B₁ este nesemnificativă.

DOZAREA ACIDULUI LACTIC IN SER

(Metoda Barker - Summerson)

Principiu

Acidul lactic prin încălzire în mediu acid trece în aldehidă acetică care în prezența p-hidroxidifenilului dă un complex violet-purpuriu.

Reactivi

- 1, Sol. CuSO₄·5H₂O 20 g %
- 2, Sol. CuSO₄·5H₂O 4 g % (se prepară extemporaneu)
- 3, Hidroxid de calciu, pulbere
- 4, Sol. acid tricloracetic 5,27 g %
5. Sol. acid tricloracetic 7,5 g %

6. Acid sulfuric conc. ($D = 1,84$)

7. Sol. p-hidroxi-difenil 1,5 %

p-hidroxi-difenil

150 mg

Sol. NaOH 5 %

1 ml

Apă bidistilată pînă la

10 ml

8. Sol. etalon acid lactic 10,6 $\mu\text{g/ml}$

lactat de litiu

10,659 mg

Sol. acid sulfuric 0,2 N

1000 ml

Modul de lucru

La 0,2 ml ser proaspăt recoltat, nehemolizat, se adaugă pentru deproteinizare 3,8 ml soluție acid tricloracetic 5,27 %, se amestecă și se lasă în repaus 5 minute. (Se poate păstra în această fază 2 - 3 zile).

Se centrifughează 15 minute la 3000 - 4000 t/m. Supernatantul este utilizat pentru dozare.

	Probă	Etalon	Martor
	ml	ml	ml
Etalon acid lactic	-	3	-
Supernatant	3	-	-
Ac. tricloracetic 7,5%	-	2	2
CuSO_4 20 %	1	1	1
Apă bidistilată	6	4	7
$\text{Ca}(\text{OH})_2$ pulbere	1 g	1 g	1 g

Se lasă în repaus 30 minute cu agitare din 10 în 10 minute. Se centrifughează 10 minute la

3000 - 4000 t/m și în alte eprubete se pipetează:

supernatant	1	1	1
CuSO_4 4 %	2 pic	2 pic	2 pic

Acid sulfuric conc

6

6

6

Adăugarea acidului se face picătură cu picătură, agitând continuu eprubeta în apă cu gheață.

Se pun eprubetele în baia de apă care fierbe, timp de 5 minute. Se răcesc apoi în apă cu gheață.

p-hidroxi-difenil

2 pic

2 pic

2 pic

Picăturile nu trebuie să cadă pe pereții eprubetei.

Se țin în baie de apă de 28 - 30° C timp de 30 minute, cu agitare din 10 în 10 minute. Se fierb apoi exact 90 secunde pentru îndepărtarea excesului de p-hidroxi-difenil. Culoarea albastră a probelor trece în violet-purpur. După răcire se citesc extincțiile probei, etalomului și martorului față de acid sulfuric conc. la 500nm.

Calcul

$$\frac{E_P - E_M}{E_E - E_M} \times 15 = \text{mg acid lactic \% ml ser.}$$

Valori normale

Ser: 5 - 20 mg %

Observații

Este necesar ca sticlăria utilizată la dozarea acidului lactic să fie spălată în felul următor: se îndepărtează rezidul din eprubete cu multă apă de robinet, se țin apoi într-o soluție de acid clorhidric 10 % pentru îndepărtarea urmelor de hidroxid de calciu. Se face apoi spălarea obișnuită.

Se folosesc eprubete din sticlă neutră cu dop rodat. Timpul de fierbere de 90 secunde trebuie respectat cu strictețe.

Interpretare

Acidul lactic este crescut după eforturi mari musculare, în stări de anoxemie (insuficiență cardiacă), în leziuni ale parenchimului hepatic, în ti-reotxicoză, în carență de vitamină B₁, în procese he-patice cu insuficiență celulară mai ales în forme grave.

DOZAREA MUCOPROTEINELOR SERICE (Metoda Varay A. și Masson M)

Principiu

Proteinele serului sînt precipitate de acidul tricloracetic, percloric, sulfosalicilic, cu excepția mucoproteinelor care dau cu acidul fosfotungstic un complex insolubil. Complexul obținut este dizolvat în hidroxid de sodiu iar concentrația mucoproteinelor este determinată prin reacția biuretului.

Reactivi

1. Sol. acid percloric 6%
2. Sol. acid fosfotungstic 5% în HCl 2 N
3. Sol. NaOH 0,4 N
4. Reactiv biuret

Sulfat de cupru cu 5H₂O

1 g

Tartrat dublu de Na și K

3 g

Iodură de potasiu	0,2 g
NaOH decarbonatat	6 g
Apă distilată pînă la	200 ml

5. Sol. etalon casienă 0,2 g% în NaOH 0,4 N

Modul de lucru

În eprubete de centrifugă se pipetează:

	Probă	Etalon
Ser	ml	ml
Ser	2	-
Acid percloric	4	-

Se filtrează. Se lasă în repaus cel puțin o oră. Peste filtrat se adaugă:

Acid fosfotungstic	0,8	-
--------------------	-----	---

Se lasă 10 minute în repaus, se centrifughează la 2000 t/m timp de 10 minute.

Lichidul supernatant se decantează și precipitatul se spală cu 2 ml acid fosfotungstic. Se centrifughează din nou, se decantează și se lucrează mai departe cu precipitatul peste care se adaugă:

NaOH	1	-
Etalon caseină	-	1
Reactiv biuret	0,4	0,4

Ambele eprubete se lasă în repaus la întuneric timp de 1 oră după care se citește extincția la 540 nm.

Calcul

$$\frac{E_p}{E_{et}} \times 100 = \text{mg \% ml ser}$$

Valori normale

Bărbați: 65 mg % ml ser

Femei: 60 mg % ml ser

DOZAREA SEMICANTITATIVA A MUCOPROTEINE-
LOR URINARE

(Metoda Donagio modificată)

Principiu

Molibdatul de amoniu precipită soluția apoasă de albastru de toluidină. Precipitarea este împiedecată de prezența mucoproteinelor din urină.

Reactivi

1. Acid acetic concentrat
2. Sol. albastru de toluidină 0,25 g ‰
3. Sol. albastru de toluidină 0,5 g ‰
4. Sol. albastru de toluidină 1 g ‰
5. Sol. molibdat de amoniu 4 g %

Modul de lucru

Se iau 10 ml urină filtrată se acidifică cu 8-10 picături acid acetic. Se fierbe la baie de apă timp de 1 minut și apoi se filtrează din nou.

In trei eprubete se pipetează:

	1	2	3
	ml	ml	ml
Urină filtrată	1	1	1
Albastru de toluidină 0,25‰	1	-	-
" " " 0,5‰	-	1	-
" " " 1 ‰	-	-	1
Molibdat de amoniu	2	2	2

Se agită toate cele trei eprubete și se lasă în repaus 24 ore dupăcare se interpretează reacția.

Interpretarea rezultatelor

Reacția este pozitivă când în fiecare eprubetă nu apare precipitat, lichidul rămânând colorat.

Reacția este negativă când avem o precipitare completă și lichidul devine clar sau poate exista o reacție intermediară când există precipitat și lichidul rămâne colorat. În acest caz se iau din tabel cifre intermediare. În mod normal reacția este negativă în toate trei eprubetele.

În caz de reacție intens pozitivă eprubetele rămân colorate fără precipitat.

Cantitatea de mucoproteine pentru diureza de 1200 ml:

Eprubeta nr.	1	2	3
Reacție negativă	50 mg‰	100 mg‰	250mg‰
Reacție pozitivă	85 mg‰	175 mg‰	500mg‰

DOZAREA HEXOZAMINELOR ÎN SER

Principiu

Hexozaminele (glucozamina și galactozamina) în mediu alcalin și în prezența acetilacetonei, formează un derivat pirolitic, care cu p - dimetilaminobenzaldehida dă un produs de condensare colorat. La reacția

de culoare, iau parte și N-acetilglucozamina respectiv N-acetil galactozamina, care apare prin acetilare cu acetil-acetona.

Reactivi

1. Alcool 95%
2. Sol. acid clorhidric 3 N
3. Sol. NaOH 3 N
4. Sol. acetalacetona

Acetalacetona 1 ml

Carbonat de sodiu 0,5 N până la 100 ml

Soluția nu poate fi folosită decât proaspătă.

5. Reactiv cromogen

Para-dimetilaminobenzaldehidă 0,8 g

Metanol 30 ml

Acid clorhidric conc. 30 ml

6. Sol. etalon de glucozamină 5 mg %

7. Sol. indicator roșu de metil 0,1 g %

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de centrifugă se introduc 0,1 ml ser proaspăt separat și 5 ml alcool 95%. Se agită și se centrifughează timp de 10 minute la 3000 t/m, după care se decantează supernatantul. Peste precipitat se adaugă 4 ml alcool 95%, iar cu o baghetă se desprinde precipitatul, agitând ușor. Se scute bagheta, spălând-o cu 1 ml alcool și se continuă operația de centrifugare și decantare ca mai sus.

Peste precipitat se adaugă 1 ml HCl 3N,

se desprinde precipitatul în același mod ca mai sus, folosind pentru aceasta încă 1 ml. HCl. Se ține la baie de apă care fierbe, timp de 4 ore. Pentru a împiedica evaporarea amestecului în timpul hidrolizei, se pune o pîlnie de glicemie în gura eprubetei de centrifugă. Se răcește eprubeta la un curent de apă, iar conținutul este filtrat printr-o hîrtie de filtru fără cenușă, într-o eprubetă gradată. Se neutralizează cu NaOH 3N în prezența roșului de metil, după care se completează cu apă distilată la 10 ml.

In următoarele eprubete de reacție se iau:

	Probă	Etalon	Martor
	ml	ml	ml
Filtrat	1	-	-
Etalon glucozamină	-	1	-
Apă distilată	-	-	1
Acetil acetonă	1	1	1

Se agită și se ține la baie de apă care fierbe timp de 20 minute, apoi se răcește la un curent de apă, adăugîndu-se în continuare:

Alcool 95%	5	5	5
Reactiv Ehrlich	1	1	1

Se agită din nou și se lasă în repaus la temperatura laboratorului 45 minute.

Se citește densitatea optică la 530 nm, față de martor.

Calcul

$$\frac{E_p}{E_e} \times 50 = \text{mg \% hexozamină}$$

DOZAREA METILPENTOZELOR IN SER

Principiu

Metilpentozele (ramnoza și fucoza) în prezența cisteinei dau o culoare galben-brună.

Reactivi

1. Sol. NaOH N/10

2. Sol. acid sulfuric

acid sulfuric conc.

6 vol,

apă distilată

1 vol.

3. Sol. 1(-) cisteină hidroclorică 3 g %

Soluția se păstrează la rece timp de trei zile.

4. Sol. etalon de ramnoză sau fucoză 20 mg %

Modul de lucru

Se procedează ca și la dozarea hexozaminelor în ser. În eprubeta de centrifugă cu precipitat (proba) și alte două eprubete se introduc:

	Probă	Etalon	Martor
	ml	ml	ml
Precipitat	+	-	-
Etalon	-	0,1	-
Sol. NaOH N/10	1	1	1
Sol. H ₂ SO ₄	4,5	4,5	4,5

Se agită și se ține la baia de apă care fierbe, timp de 3 minute după care se răcește la un curent de apă, adăugându-se în continuare:

Sol. cisteină	0,1	0,1	0,1
---------------	-----	-----	-----

Se agită și se lasă să stea la temperatura laboratorului timp de 60 - 90 minute.

Se citește densitatea optică a probei, etalonului și a martorului, față de apă distilată și sub o grosime de strat de cel puțin 1 cm, la 396 nm și 430 nm.

Calcul

$$\frac{(E_p 396 - E_p 430) - (E_m 396 - E_m 430)}{E_e 396 - E_e 430} =$$

mg metilpentoze % ml ser.

Valori normale

Metilpentoze = 8,9 ± 0,6 mg % ml ser

Observații

Reacția de culoare este stabilă timp de 12 ore.

Hidroliza țesuturilor trebuie făcută timp de 14 ore.

Roșu de metil nu interferează cu reactivul Ehrlich.

Reacția poate fi folosită și pentru lichidele biologice, care conțin urme de glucozamină sau de galactozamină.

Densitatea optică pentru aceeași concentrație de glucozamină sau galactozamină este identică.

Hidroliza produselor biologice poate fi înlocuită prin adausul la precipitat a 2 ml dintr-o

soluție de metanol, care conține 3% anhidridă acetică și 0,5% acetat de sodiu anhidru. După agitare se lasă să stea în repaus 4 ore. Amestecul este neutralizat cu 2 ml soluție carbonat de sodiu 0,5 N.

Interpretare

Modificările biochimice premergătoare collagenizării tramei fibroase a ficatului pot fi puse în evidență, prin determinarea mucopolizaharidelor și a glucozaminei. Concentrația acestora crește după 6 săptămâni de la inducerea leziunii hepatice. De asemenea și alte collagenoze și respectiv granulomatoze se însoțesc de modificări în concentrația mucopolizaharidelor. În hepatita incipientă, crește concentrația în galactozamină, cu tendință la normalizare în primele 4 săptămâni.

3. Sol. tungstat de sodiu 10%
4. Sol. acid sulfuric 2/3 N
5. Sol. acid clorhidric 1 N
6. Sol. etalon creatinină 1%

In momentul întrebuintării se diluiază:

Sol. creatinină 1%	10 ml
Acid clorhidric 1 N	10 ml
Apă distilată pînă la	1000 ml

Concentrația acestei soluții este de 10 mg %.

Modul de lucru

Intr-un balon cotat de 25 ml se introduc:

apă distilată	10 ml
ser	2,5 ml
tungstat de sodiu	2,5 ml
acid sulfuric 2/3 N	2,5 ml

Se agită și se filtrează. In alte două baloane cotate, de aceeași capacitate, se introduc:

	Probă	Etalon
	ml	ml
Filtrat	10	-
Etalon	-	1
Acid picric	5	5
NaOH 10%	1	1

Apă distilată pînă la 25 ml.

Se agită, se lasă în repaus timp de 5 minute la temperatura camerei, după care se citește extincția probei și a etalonului față de apă distilată la 530 nm.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 10 = \text{mg \% creatinină în ser.}$$

Valori normale

Creatinină în ser = 10 mg %.

DOZAREA CREATININEI IN URINAPrincipiu

Același ca la dozarea creatininei în sânge.

Reactivi

1. Sol. acid picric 1,2 %
2. Sol. NaOH 10 %
3. Sol. etalon creatinină 1 %

Modul de lucru

În două baloane cotate cu o capacitate de 50 ml se iau:

	Probă	Etalon
	ml	ml
urină	1	-
etalon creatinină 1‰	-	1
acid picric	15	15
NaOH	1,5	1,5
apă distilată pînă la 50 ml		

Se agită și se procedează ca la dozarea creatininei în sânge.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_F} \times 1 = g \% \text{ creatinină în urină.}$$

Valori normale

Bărbați : 1 g %

Femei: 0,7 g %

Observații

Reacția de culoare nu este specifică, ea putînd fi influențată pozitiv de valori crescute în sînge și urină a glucozei, fructosei, vitaminei C, corpiilor cetonici, androgenilor și corticosteroizilor

Interpretare.

Creatinina este constituentul azotat cu concentrație sanguină fixă, neinfluențată de regimul alimentar, efort fizic sau alte activități fiziologice

Concentrația sanguină a creatininei totale crește numai în afecțiuni renale. În afara nefropatiilor propriu-zise, variații ale concentrației sanguine a creatininei se mai întîlnesc și în afecțiunile în care există o cointeresare renală, cum ar fi eclampsia, guta și unele afecțiuni hepatice. În aceste cazuri concentrația creatininei nu este paralelă cu a ureei.

Sursele principale ale creatininei urinare sînt creatina și fosfocreatina, constituent important al mușchiului striat.

Dozarea creatininei în sînge și urină se utilizează și pentru stabilirea clearance-ului creatininei care suferă modificări în nefrite.

DOZAREA ACIZILOR AMINATI IN URINA

Principiu

Acizii α -aminați, dau cu ninhidrină o colorație albastră-violet, a cărei intensitate este direct proporțională cu concentrația.

Reactivi

1. Sol. ninhidrină 2% în alcool de 96°

2. Sol. etalon stoc de glicocol

Glicocol 267 mg

Benzoat de sodiu 1 g

Acid clorhidric 0,077 N la 500 ml

3. Sol etalon stoc de acid glutamic

Acid glutamic 525 mg

Benzoat de sodiu 1 g

Acid clorhidric 0,07 N la 500 ml

4. Sol etalon de lucru

Se amestecă părți egale din cele două soluții etalon stoc, după care se neutralizează, adăugând pentru aceasta 0,7 ml NaOH N la 10 ml soluție etalon. Soluția etalon astfel neutralizată este diluată în proporție de 1/20 în alcool de 96°. 1 ml din această soluție conține 5 mg de azot aminat.

5. Alcool 96°

Modul de lucru

Intr-o eprubetă se pipetează 5 ml apă distilată și 1 ml urină din 24 ore și se agită. Din această diluție se ia 1 ml într-o eprubetă de centrifugă și se adaugă 10 ml alcool de 96°. Se centrifu-

ghează 10 minute la 2500 t/m.

In eprubete de centrifugă se introduc:

	Probă	Etalon	Martor
	ml	ml	ml
Supernatant	1,5	-	-
Sol. etalon de lucru	-	1	-
Alcool 96°	-	0,5	1,5
Sol. ninhidrină	1,5	1,5	1,5

Se agită, se pun la baie de apă de 70°C timp de 1 minut, după care se răcesc sub curent de apă. Se citește la 530 nm extincția probei și a etalonului față de martor.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 5 \times 84 = \text{azot aminat în mg \%}$$

Valori normale

Copii: 50 - 200 mg %

Adulți: 500 mg azot aminat în urina din 24 ore.

Observații

Cortizomul, ACTH-ul și tetraciclinele dau rezultate crescute.

Interpretare

Valori crescute întâlnim în sindromul lui De Toni Fanconi, maladia Wilson și maladia lui Hartnup

DOZAREA AMONIACULUI IN PLASMA

Principiu

Amoniacul din plasmă este antrenat prin agitare în mediu alcalin și fixat pe acid sulfuric, sub formă de sulfat de amoniu, care în prezența fenolului și a hipocloritului de sodiu dă o culoare albastră.

Reactivi

1. Carbonat de potasiu cristalizat pulbere
2. Bicarbonat de potasiu pulbere
3. Sol. acid sulfuric 1 N
4. Sol. fenolat de sodiu

fenol cristalizat proaspăt distilat	25 g
hidroxid de sodiu	0,1 g
apă bidistilată pînă la	1000 ml
5. Sol. nitroprusiat de sodiu

sol. apoasă nitroprusiat 10 %	1 v
acid acetic glacial	1 v

In momentul întrebuintării se face o diluție de 1 volum soluție nitroprusiat la 99 volume de apă bidistilată.

6. Sol. hipoclorit în tampon fosfat

Sol. A $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	179,1 g
NaOH	6 g
apă bidistilată pînă la	1000 ml
- Sol. B hipoclorit de sodiu 28° clorometrice

In momentul întrebuintării se face un

amestec din 27 volume soluție A și 3 volume soluție B.

7. Sol. etalon de 100% NH_3 /ml

clorură de amoniu

0,2972 g

acid sulfuric 1N

20 ml

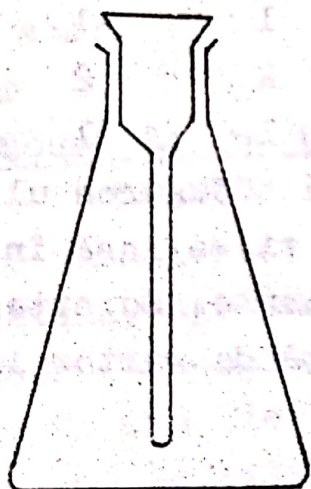
apă bidistilată pînă la

1000 ml

În momentul întrebuintării se face o diluție de 1 : 50. La 20 ml soluție de lucru, corespunde 2×10^{-3} NH_3 .

Modul de lucru

Aparatul de difuziune, necesar pentru dozarea amoniacului, este format dintr-un balon Erlenmeyer din sticlă neutră cu o capacitate de 100 ml și



închis cu un dop rodat, prevăzut cu o baghetă de sticlă, turtită la capătul de jos și care coboară în interior pînă la 2 cm de fundul balonului.

În două aparate de difuziune (martor și probă), se introduc fără a

atinge pereții, câte 2 g K_2CO_3 , 1 g KHCO_3 și câte o baghetă pentru agitare, electromagnetică. În probe se adaugă 2 ml plasmă. Fiecare tijă este cufundată în soluție de H_2SO_4 1 N pe o înălțime de 1,5 cm. Se șterge vârful tijelor cu hîrtie de filtru pentru a îndepărta excesul de H_2SO_4 ce s-ar putea colecta sub formă de picătură. Se închid baloanele și se pun la agitatorul electromagnetic timp de 30 minute, imprimîndu-se

o turație de 40 t/m. Temperatura trebuie să fie cuprinsă între 17 și 22°C. Se scot tijele și se spală cu câte 4 ml apă bidistilată, colectându-le separat în eprubete de reacție, prevăzute cu dop rodat. Paralel se face și un etalon. Reacția de culoare se face astfel:

	Probă	Etalon	Martor
	ml	ml	ml
Apele de spălare	4	-	4
Apă bidistilată	-	2	-
Etalon	-	2	-
Fenolat de sodiu	2	2	2
Nitroprusiat	1	1	1
Tampon hipoclorit	2	2	2
Apă bidistilată	1	1	1

Se agită imediat și după adăugarea ultimului reactiv se acoperă eprubetele și se lasă în repaus la întuneric timp de 30 - 40 minute. Se citește extincția probei și a etalonului față de martor la 625 nm.

Calcul

$$\frac{E_p}{E_E} \times 2 \times 500 = \gamma \text{ amoniac la } 1000 \text{ ml plasmă.}$$

Valori normale

Amoniac în plasmă: 400 - 1000 γ %.

Observații

Apa bidistilată trebuie să fie proaspăt distilată.

L I P I D E

DOZAREA LIPIDELOR TOTALE

Principiu

Lipidele totale din ser sînt extrase la cald cu amestec alcool-eter. Extractul este evaporat la sec, după care reziduul este cîntărit.

Reactivi

1. Amestec alcool-eter

alcool 30 ml

eter 10 ml

2. Eter

Modul de lucru

Intr-un balon Erlenmayer se iau 20 ml amestec alcool-eter și se adaugă 1 ml ser, picătură cu picătură, agitînd după fiecare picătură. Se agită 10 minute la temperatura camerei, după care se ține în baia de apă fierbinte timp de 1 minut, agitînd în continuare. Se filtrează apoi printr-un filtru cantitativ plisat și degresat în prealabil cu alcool-eter. Se spală cantitativ balomul cu precipitat de 2 ori cu cîte 5 ml eter ușor încălzit.

Filtratul și eterul de spălare se trec într-o capsulă. Se evaporă conținutul capsulei pe baie de apă la sec. Reziduul se reia din nou cu eter și se filtrează prin filtru cantitativ, plisat, într-o capsulă, care a fost în prealabil tarată (greutatea = G).

Se evaporă eterul pe baia de apă (departe de flacără). Se răcește capsula, apoi se cântărește și se menține în exicator pînă la pond constant. Se notează greutatea G' .

Calcul

$(G' - G) \times 1000 = \text{g lipide din } 1000 \text{ ml ser.}$

Valori normale

5 - 7 g la 1000 ml ser.

DOZAREA LIPIDELOR TOTALE DIN SER

Principiu

Lipidele din ser, în mediu de acid sulfuric și în prezență de acid ortofosforic și vanilină, dau o colorație roz.

Reactivi

1. Acid sulfuric concentrat ($D=1,84$)
2. Acid ortofosforic ($D=1,71$)
3. Sol. vanilină 0,6 g %

Pentru dizolvarea completă a vanilinei, soluția se încălzește ușor. Se conservă la întuneric și la temperatura laboratorului, cît timp soluția rămîne incoloră.

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de reacție se introduc:	
acid sulfuric	4,8 ml
ser nehemolizat	0,2 ml

Se agită și se ține la baie de apă care fierbe timp de 10 minute, după care se răcește la un curent de apă.

In alte eprubete de reacție se introduc:

	Proba	Martor
	ml	ml
Acid sulfuric conc.	-	0,2
Amestec acid sulfuric/ser	0,2	-
Acid ortofosforic	3,8	3,8
Sol. vanilină	1	1

Se agită pentru a obține un amestec omogen însă lipsit de bule de aer. Se ține timp de 15 minute în baie de apă la 37°C, apoi 15 minute la temperatura laboratorului, după care se centrifughează, dacă este nevoie, 5 minute la 5000 t/m.

Se citește extincția probei față de martor la 530 nm. (500nm - 550 nm) și sub o grosime de strat de 1 cm.

Calcul

Indicele lipemic = extincția

Valori normale

Indicele lipemic = $0,323 \pm 0,06$

Observații

Pentru obținerea unui indice lipemic corespunzător, se fac un număr de determinări pe subiecți sănătoși din punct de vedere clinic, apoi se calculează media rezultatelor. Numai o medie statistică permite să se obțină un rezultat riguros.

Deoarece lipidele din ser au o compoziție heterogenă și fiecare constituent dă o colorație roz cu reactivul SPV de intensități variabile, se poate stabili o curbă etalon folosind pentru aceasta un amestec de cel puțin 10 seruri de la subiecți examinați și considerați sănătoși, la care se determină în prealabil prin metoda gravimetrică.

Legea lui Lambert-Beer nu este respectată decât până la concentrații de 10 g % lipide totale ceea ce necesită în prealabil diluarea serurilor hiperlipemice cu ser fiziologic pentru a lucra numai în aceste limite. La serurile normale există o concordanță între metoda gravimetrică și cea care utilizează reacția SPV.

Încălzirea peste limita de timp indicată nu jenează reacția.

Colorația este stabilă în jur de o oră.

DOZAREA LIPIDELOR TOTALE DIN SER PRIN REACȚIA SPV MODIFICATA

Principiu

Lipidele din ser, în mediu de acid sulfuric și în prezența reactivului fosfo-vanilinic, dau o colorație roz.

Reactivi

1. Acid sulfuric conc. ($D = 1,84$)
2. Reactiv cromogen:

Fosfat monopotasic (KH_2PO_4) 6 g

Vanilină

0,3 g

Apă distilată la

100 ml

Modul de lucru

	Proba	Martor
	ml	ml
Acid sulfuric conc.	1	1
Ser diluat 1/20	0,1	-

Se agită și se ține în baie de apă care fierbe timp de 20 minute, după care se răcește la un curent de apă.

Reactiv cromogen

2

2

Se agită, se lasă în repaus 10 minute la temperatura laboratorului după care se centrifughează la 5000 t/m timp de 5 minute.

Se citește extincția probei față de martor la 530 nm.

Calcul

Extincția probei = indicele lipemic.

Valori normale

Indicele lipemic = $0,323 \pm 0,06$

Observații

Racția SPV modificată beneficiază de aceleași reguli ca și metoda originală a lui Smidt, descrisă anterior.

X DOZAREA COLESTEROLULUI TOTAL IN SER X

(Metoda Grigaut)

Principiu

Colesterolul, solvit în cloroform, în pre-

zența anhidridei acetice și acidului sulfuric concentrat formează un compus de culoare verde.

Reactivi

1. Alcool sodat:

alcool 60°

100 ml

NaOH

0,5 g

2. Eter

3. Cloroform

4. Anhidridă acetică

5. Acid sulfuric concentrat

6. Sol. etalon colesterol 0,06 g % în cloroform

Modul de lucru

Intr-o pîlnie Grigaut se introduc 6,5 ml alcool sodat și 1 ml ser și se adaugă 7,5 ml eter. Se amestecă cu atenție pentru a nu se emulsiona și presiunea vaporilor să nu arunce dopul. Se lasă în repaus 5 minute timp în care se separă două straturi: un strat inferior - apos și un strat superior - alcool-eter în care se află extras colesterolul.

Se scoate dopul și se deschide cu precauție robinetul lăsînd să se scurgă stratul inferior pînă la limita de separare a celor două straturi.

Pentru a îndepărta alcoolul din eter se spală cu 10 ml apă distilată care se vor prelinge pe pereții pîlniei. Se amestecă ușor, se lasă în repaus 5 minute și se îndepărtează stratul inferior apos. Se repetă operația încă odată.

Stratul de eter este adus într-o capsulă perfect curată și uscată pe la partea superioară a

pîlniei de separare. Se spală pîlnia de două ori cu cîte 3 ml eter care se trec de asemenea în capsulă în același mod.

Se evaporă conținutul capsulei pe baia de apă. Reziduul se reia cu 1 ml cloroform și se trece într-o eprubetă gradată. Se repetă operația pînă la volumul de 2,5 ml. În altă eprubetă gradată se introduc 2,5 ml soluție etalon de colesterol. Se adaugă în ambele eprubete cîte 1 ml anhidridă acetică și 3 picături acid sulfuric concentrat, se astupă eprubetele cu dop și se lasă la întuneric 30 minute. Se citesc extincțiile probei și etalonului față de apă distilată la 560 - 580 nm.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 1,5 = \text{g colesterol la 1000 ml ser,}$$

Valori normale: 1,6 - 1,8 g %

Observații

Dintre metodele folosite pentru dozarea colesterolului, metoda Grigaut este cea mai fidelă, datorită faptului că prin folosirea alcoolului sodat cenapsele lipoproteice sînt desfăcute, în eter trecînd numai colesterolul.

Reacția de culoare nu este interferată de compuși care reacționează cu acidul sulfuric (triptofan, acizi biliari, etc.).

Pipetele și sticlăria trebuie să fie

uscate pentru că prezența urmelor de apă scade intensitatea culorii și provoacă emulsie.

DOZAREA COLESTEROLULUI IN SER

(Metoda P.F.Ferro și A.B. Ham modificată de Huang)

Principiu

Metoda se bazează pe reacția Lieberman utilizată și la metoda Grigaut.

Reactivi

1. Reactiv cromogen

acid acetic glacial	30 ml
anhidridă acetică	60 ml
acid sulfuric conc.	10 ml
sulfat de sodiu anhidru	2 g.

Amestecul se face la rece. Se poate și fără sulfat de sodiu.

2. Sol. etalon colesterol:

colesterol	0,2 g
acid acetic glacial	100 ml

Modul de lucru

	Probă	Etalon	Martor
	ml	ml	ml
Reactiv cromogen	2,5	2,5	2,5
Ser	0,1	-	-
Etalon colesterol	-	0,1	-
Apă distilată	-	-	0,1

Se lasă în repaus 20 de minute la temperatura camerei după care se citește extincția la 550-650 nm față de martor.

Precipitatul care apare dispare după agitare.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 2 = \text{g colesterol la 1000 ml ser}$$

Valori normale

1,8 - 2 g la 1000 ml ser

DOZAREA COLESTEROLULUI IN SER

(Metoda Zak-Henly modificată de Yoshikawa)

Principiu

Colesterolul din ser în prezența clorurii ferice și a acidului sulfuric dă o culoare violet.

Reactivi

1. Sol. clorură ferică în acid acetic 0,8 g %
2. Acid sulfuric concentrat
3. Sol. etalon colesterol

Colesterol	0,3 g
Acid acetic până la	100 ml

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de centrifugă necesară pentru probă și în următoarele eprubete de reacție

se pipetează:

	Probă	Etalon	Martor
	ml	ml	ml
Clorură ferică	7,5	7,5	7,5
Ser	0,1	-	-
Etalon	-	0,1	-
Apă distilată	-	0,1	0,1
Acid acetic	0,4	0,3	0,4

Se agită și se lasă în repaus timp de 10-15 minute după care eprubeta de centrifugă cu ser, se centrifughează timp de 10 minute la 2500 t/m sau se filtrează. Reacția de culoare se continuă în alte eprubete:

Filtrat probă	6	-	-
Amestec etalon	-	6	-
Amestec martor	-	-	6
Acid sulfuric conc.	4	4	4

Se agită și se lasă la temperatura laboratorului și la întuneric timp de 30 de minute după care se citesc extincțiile la 560 nm.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 3 = \text{g colesterol la 1000 ml ser}$$

Valori normale

1,80 g la 1000 ml ser

Observații

Reacția de culoare este stabilă timp de 30 de minute la temperatura laboratorului.

Legea lui Beer este respectată pînă la o concentrație de 5 gr %, ceea ce presupune o diluție a serului cu ser fiziologic și deci o nouă determinare pentru serurile a căror concentrație în colesterol depășește această valoare.

Apa distilată se adaugă atît la etalon cît și la martor pentru a avea aceeași concentrație ca și la ser prezența acesteia modificînd reacția de culoare.

DOZAREA COLESTEROLULUI IN SER

(Metoda turbidimetrică)

Principiu

Colesterolul total din ser, poate fi determinat prin măsurarea turbidității produsă de adiția alcoolatului de sodiu la ser.

Reactivi

1. Sol. etilat de sodiu 56%

Alcool absolut	45 ml
----------------	-------

NaOH 30%	1 ml
----------	------

Apă distilată	35 ml
---------------	-------

2. NaCl 9 g %

3. Sol. etalon colesterol

Colesterol	0,3 g
------------	-------

Alcool etilic pînă la	100 ml
-----------------------	--------

Modul de lucru

In următoarele eprubete de reacție se iau:

	Probă Martor		Etalon Martor	
	probă		etalon	
	ml	ml	ml	ml
Ser fiziologic	1	6	1	6
Ser	0,2	0,2	-	-
Etalon colesterol	-	-	0,2	0,2
Etilat de sodiu	5	-	5	-

Se agită și se lasă în repaus timp de 10 minute la temperatura laboratorului.

Se citește densitatea optică a probei față de martor probă și a etalonului față de martor etalon la 550 nm.

Calcul

$$\frac{E_p}{E_{et}} \times 3 = g \text{ colesterol la } 1000 \text{ ml ser}$$

Valoarea normală

1,6 - 1,8 g la 1000 ml ser

Observații

Se poate stabili și o curbă etalon fie cu soluție alcoolică de colesterol fie folosind un amestec de seruri la care s-a dozat în prealabil colesterolul prin metoda Grigaut.

Metoda furnizează rezultate corespunzătoare și la serurile care au concentrații variabile de bilirubină sau proteine.

Poate fi folosită și o soluție standard de sulfat de bariu preparată în felul următor:

Sol. $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1,173 g % 3 ml

Acid sulfuric 0,2 N pînă la 100 ml

Această soluție corespunde la o concentrație de 3 g % colesterol.

DOZAREA COLESTEROLULUI ESTERIFICAT

Principiu

Este același ca și la metoda Grigaut, cu deosebirea că din extractul total se îndepărtează colesterolul liber cu digitonină și apoi se dozează colesterolul rămas.

Reactivi

1. Solvent Caminade:

Acetonă 73 ml

Apă distilată 18 ml

Alcool absolut 9 ml

2. Sol. digitonină:

Digitonină 0,5 g

Solvent Caminade 100 ml

Modul de lucru

Se procedează în mod identic ca și la determinarea colesterolului total, pînă în momentul obținerii reziduului grăsos (vezi metoda Grigaut).

Reziduul grăsos nu se mai reia cu clorofom, tratîndu-se cu 5 ml solvent Caminade. Pentru a se

asigura solvirea, se așează capsula pe baie de apă. Se adaugă apoi după solvire 3 ml din soluția de digitonina. Se amestecă. Se lasă în repaus 10 minute, în care timp colesterolul liber se combină cu digitonina. Se ~~filtrază~~ filtrează apoi într-o capsulă. În filtrat trece colesterolul esterificat. Se spală filtrul prin introducerea de eter în pîlnie. Eterul, care a antrenat colesterolul esterificat de pe hîrtia de filtru se aduce în capsulă. Se procedează mai departe exact ca la dozarea colesterolului total.

Observații

Colesterolul liber se obține prin scăderea cantității de colesterol esterificat din colesterolul total.

DOZAREA COLESTEROLULUI LIBER SI ESTERIFICAT

(Metoda Assous, E.F și Girard, M.L)

Principiu

Colesterolul, în mediu de acid acetic, reacționează cu soluția sulfurică de clorură ferică, dînd o culoare roșie-violet, ca urmare a unui proces de deshidratare cu oxidarea colesterolului. În condiții diferite de temperatură și timp, se poate face o dozare selectivă a colesterolului liber și total.

Reactivi

1. Acid acetic concentrat și purificat

Se ține timp de 24 ore acidul acetic concentrat în contact cu anhidrida sau acidul cronic (20 g pentru 1000 ml acid acetic), apoi se distilă eliminându-se prima și ultima fracție.

2. Sol. clorură ferică, în acid acetic conc., 1%

3. Amestec acid acetic conc. cu acid sulfuric conc. 1:1

Se adaugă cu precauție acid sulfuric concentrat în acid acetic. Se agită în permanență. Se lasă să se răcească.

4. Sol. etalon de colesterol

Colesterol	0,3 g
Acid acetic pînă la	100 ml

Modul de lucru

	<u>Colesterol total</u>			
	Probă	Martor	Etalon	Martor
	probă			etalon
	ml	ml	ml	ml
Ser	0,05	0,05	-	-
Etalon	-	-	0,1	0,1
Apă bidistilată	0,05	0,05	-	-
Ac. acetic conc.	2,7	2,9	2,7	2,9
Sol. FeCl ₃	0,2	-	0,2	-

	<u>Colesterol liber</u>			
	Probă	Martor	Etalon	Martor
	probă			etalon
	ml	ml	ml	ml
Ser	0,1	0,1	-	-

Etalon	-	-	0,1	0,1
Acid acetic concentrat	0,7	0,9	0,7	0,9
Sol. FeCl_3	0,2	-	0,2	-

Eprubetele de reacție pentru dozarea colesterolului liber, sînt puse într-o baie de apă de aproximativ 20°C pentru a lua temperatura băii. Se introduc lent pe pereții eprubetelor reactivii următori, și se așteaptă un minut pentru a permite acestora să ajungă în fundul eprubetelor. Pentru colesterolul total se adaugă în cele 4 eprubete cîte 2 ml acid sulfuric concentrat. Pentru colesterolul liber se adaugă amestec acid acetic-acid sulfuric 4 ml.

Se agită puternic. Eprubetele pentru dozarea colesterolului total sînt lăsate să se răcească spontan la temperatura laboratorului, iar eprubetele pentru dozarea colesterolului liber se introduc din nou în baia de apă de 20°C .

Se lasă apoi toate eprubetele în repaus timp de 30 de minute, după care se citește extincția probelor și etaloanelor față de martorii respectivi, la 560-580 nm.

Calcul

$$\frac{E_p}{E_s} \times 3 = \text{g colesterol (liber sau total) la } 1000 \text{ ml ser.}$$

Valori normale

Colesterol liber $0,7 \text{ g} \pm 0,2 \text{ g}$ la 1000 ml ser

Colesterol total $2 \pm 0,4 \text{ g}$ la 1000 ml ser

Colesterol liber = $0,32 \pm 0,05$
Colesterol total

Observații

Acidul acetic și sulfuric nu trebuie să conțină substanțe oxidante (urme de HNO_3), căci duc la apariția unei oxidări secundare cu diminuarea densității optice.

Acidul acetic trebuie să fie lipsit de acetaldehidă, deoarece aceasta în prezența unor constituenți din ser de natură indolică (triptofanul) și în mediul de acid sulfuric dă o reacție de culoare, parazitară de intensitate mare.

Calitatea reactivului se verifică astfel: la 0,2 ml ser nehemolizat se adaugă 2,8 ml acid acetic. Se agită, după care se adaugă 2 ml acid sulfuric concentrat. Se agită din nou. Culoarea care apare, trebuie să fie sensibil aceeași cu cea obținută prin amestecul a 0,2 ml ser cu 4,8 ml acid sulfuric conc. Un acid acetic impur dă în aceste condiții o colorație violetă sau brună.

Martorul pentru ser este necesar pentru a înlătura incidența culorilor parazitare datorită în particular proteinelor, bilirubinei și hemoglobinei. Un martor ideal trebuie să satisfacă 2 exigențe: intensitatea colorației compușilor parazitari trebuie să fie aceeași atât în martor cât și în probă; substanța de analizat, în cazul nostru colesterolul, nu trebuie să participe la colorația martorului.

Reacția de culoare prezintă următoarele

avantaje:

sensibilitatea este mai mare decît la
reacția Lieberman

maximum de culoare în 30 de minute
stabilitatea culorii cel puțin o oră
identitatea desvoltării culorii atît pen-
tru colesterolul liber cît și pentru cel esterificat.

Antipirina, acidul salicilic, salicilatul
de sodiu, acidul fenil piruvic prezenți în mediul bio-
logic pot da o culoare parazitară.

DOZAREA COLESTEROLULUI DIN FRACTIUNEA BETA LIPOPROTEICA

Principiu

Lipoproteinele serice (B.L.P.) de densita-
te mică sînt precipitate selectiv de către heparină
și în prezență de cationi bivalenți.

Reactivi

1.Sol.Clorură de calciu 0,1M

Clorură de calciu anhidră 11,1 g

Apă distilată pînă la 1000 ml

2.Sol.clorură de calciu 0,025 M

Extemporaneu se diluează 1 volum din sol.nr.1
cu 3 volume apă distilată

3.Sol.heparină 1% în greutate

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de centrifugă se pipetează:

Clorură de calciu	10 ml
Ser	1 ml
Heparină	0,2 ml

Se agită și se centrifughează timp de 15 minute la 3000t/m, sau se lasă pînă a doua zi. Se decantează supernatantul, iar precipitatul este redisolvat în 2 ml ser fiziologic, din care se dozează colesterolul după metodele descrise anterior.

DOZAREA BETA LIPOPROTEINELOR SERICE (reacția cu fenol a lui Kunkel)

Principiu

Complexele lipoproteice sînt precipitate, de către o soluție fenolică de concentrație salină determinată. Turbiditatea mediului este datorită unei emulsii a lipidelor eliberate și a unei floculări a proteinelor.

Reactivi

1. Sol. fenolică

Fenol proaspăt distilat	1 g
Clorură de sodiu	12 g
Apă distilată de 60°C	50 ml

Se agită pînă la solvirea completă se răcește la un curent de apă și se completează cu apă distilată pînă la 100 ml. Se filtrează. Soluția trebuie să fie incoloră.

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de dimensiuni egale cu cele din scara Mc Lagan se pipetează

Soluție fenolică	3,6 ml
Ser	0,2 ml

Se agită prin răsturnare și se lasă în repaus la temperatura laboratorului timp de 30 de minute.

Se măsoară intensitatea floculării proteinelor și lipoproteinelor față de scara pentru timol a lui Mac Lagan.

Calcul

unități turbidimetrice X 8 = unități Vernes

Valori normale

Beta lipoproteinele din ser = 35 u.Vernes

Observații

Un factor de corecție arbitrar permite transformarea unităților turbidimetrice obținute în lipide totale (unități turbidimetrice x 16,6) + 267 = mg % lipide totale.

DOZAREA TRIGLICERIDELOR SERICEPrincipiu

Trigliceridele serice sînt extrase selectiv cu ajutorul alcoolului izopropilic, în timp ce fosfolipidele, pigmentii biliari și glucoza sînt adsorbite pe un amestec de extracție. Trigliceridele extrase, sînt saponificate ulterior, iar glicerolul e-

liberat este oxidat în aldehydă formică, care în prezența acetil-acetonei dă un complex colorat în galben.

Reactivi

1. Amestec de extracție

Oxid de aluminiu	200 g
Sulfat de cupru ($5H_2O$)	10 g
Hidroxid de calciu	20 g
Reactiv Lloyd (Hartman Liddon Co)	20 g

Se amestecă bine într-un mojar. Oxidul de aluminiu trebuie în prealabil uscat la $110^{\circ}C$.

2. Sol. alcoolică de KOH

KOH	0,6 g
Alcool izopropilic până la	10 ml

Acest reactiv poate prezenta un precipitat în timpul conservării, de aceea trebuie filtrat în momentul întrebuințării.

3. Sol. stock de metaperiodat de sodiu

Metaperiodat de sodiu	0,054 g
Acid acetic glacial	1,15 ml
Apă bidistilată până la	10 ml

4. Sol. Oxidantă

sol. stock de metaperiodat de sodiu	1 ml
alcool izopropilic	2 ml
apă bidistilată	2 ml

Soluția nu poate fi folosită decât în ziua în care a fost preparată.

5. Sol. acetat de amoniu 15,5 g %

Se ajustează pH-ul cu acid acetic până se obține un $pH = 6 \pm 0,05$

6. Acetil-acetonă

7. Reactiv cromogen

Sol. acetat de amoniu

4 ml

Acetil-acetonă

0,1 ml

Amestecul se conservă 1 lună la $+ 4^{\circ} \text{C}$

8. Sol. etalon de trioleină

Trioleină

2 g

Alcool izopropilic pînă la

100 ml

In momentul întrebuintării se diluiază

0,2 ml din această soluție la 10 ml alcool izopropilic

9. Alcool izopropilic

Alcoolul izopropilic trebuie să fie lipsit de compuși aldehidici care dau aceeași reacție de culoare cu acetil-acetona. Martorul examinat la 405 nm (308 - 405 nm) față de apa distilată trebuie să aibă un procentaj de transmisie cuprins între 80 - 100 %. In caz contrar, alcoolul izopropilic trebuie distilat după tratare cu hidrobiorură de sodiu.

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de centrifugă pravăzută cu dop rodat se introduc 2,8 ml alcool izopropilic și 2 g amestec pentru extracție, se astupă eprubeta și se agită pînă cînd amestecul pentru extracție se impregnează complet cu solvent. Se adaugă 0,2 ml ser, se agită eprubeta timp de 1 minut, apoi se adaugă 7 ml alcool izopropilic. Se agită din nou timp de 1 minut, se lasă în repaus 30 minute cu agitare din 10 în 10 minute. Se centrifughează timp de 10 minute la 5000 t/m.

	Proba	Etalon	Martor
	ml	ml	ml
Supernatant	2	-	-
Sol. etalon diluat	-	2	-
Alcool izopropilic	-	-	2
Sol. alcoolică de KOH	0,5	0,5	0,5

Se agită ușor și se pune la baie de apă de 60° C timp de 15 minute și se răcesc la curent de apă.

Sol. oxidantă	1	1	1
---------------	---	---	---

Se agită

Reactiv cromogen	0,5	0,5	0,5
------------------	-----	-----	-----

Se agită, se pun la baie de apă de 50° C timp de 30 minute, după care se răcesc.

Se citesc extincțiile probei și etalonului față de martor la 405 nm.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 2 = \text{trigliceride în g \% (exprimate în trioleină)}$$

Valori normale

Femei: 0,4 - 1,15 g %.

Bărbați: 0,5 - 1,55 g %.

Observații

Culoarea este stabilă pentru o oră.

DOZAREA TRIGLICERIDELOR SERICE

Principiu

Trigliceridele serice sînt extrase selectiv cu un sistem binar de solvent: alcool și eter de petrol. Glicerina eliberată prin saponificare este oxidată cu acid periodic în aldehydă și acid formic care în prezența acidului cromotropic dă un complex colorat în roz.

Reactivi

1. Amestec etanol - eter de petrol 1:1 (v:v)
2. Amestec etanol - eter de petrol 4:1 (v:v)
3. Sol. hidroxid de potasiu în alcool

KOH	2 g
Alcool 96° la	100 ml

In momentul întrebuintării se diluiază 1/5 în alcool 96°.

4. Sol. metaperiodat de sodiu

metaperiodat de Na	1,06 g
acid sulfuric conc,	2 ml
apă bidistilată pînă la	100 ml

5. Sol. arsenit de sodiu

NaOH	2,25 g
As ₂ O ₃	5 g
apă bidistilată pînă la	100 ml

6. Sol. acid cromotropic 0,2 %

Sol. A

acid cromotropic	1 g
apă bidistilată la	100 ml

Sol.B

Apă bidistilată	500 ml
-----------------	--------

Acid sulfuric	300 ml
---------------	--------

Se amestecă soluția A cu B ținând balonul într-un vas cu apă rece și agitând continuu prin rotire. Se completează cu apă distilată până la 1000.

7. Sol. etalon trioleină 2 g %, în clorofom.

În momentul întrebuintării se diluiază 0,2 ml din această soluție la 10 ml, cu alcool izopropilic.

Modul de lucru

Intr-o eprubetă cu dop rodat se introduc 2 ml amestec alcool-eter de petrol 1:1 și 0,1 ml ser. Se amestecă, se ține la baie de apă la fierbere timp de 1 minut agitând continuu după care se răcește la temperatura camerei. Se adaugă cu un cilindru sau cu biureta 6 ml eter de petrol. Se amestecă prin rotirea eprubetei. Se adaugă 1 ml apă bidistilată, se amestecă din nou, se lasă în repaus 2-3 minute la temperatura camerei sau până când se formează o limită de separare netă între cele două faze.

Faza superioară care conține trigliceridele extrase este transferată într-o eprubetă gradată și cu dop rodat cu ajutorul unei pipete cu pară.

Peste faza inferioară se pun 2 ml eter de petrol pentru o nouă extracție. Această operație se repetă până se completează eprubeta gradată la 10 ml. Se amestecă conținutul prin rotirea eprubetei apoi este distribuit în eprubete cu dop rodat.

	Probă	Martor	Etalon
	ml	ml	ml
Extract	4	4	-
Soluție trioleină diluată	-	-	2
Amestec etanol-eter (4:1)	1	1	1
Apă bidistilată	0,1	0,1	-

Proba și martorul se agită și se lasă la temperatura camerei timp de 2-3 minute pînă cînd se formează o limită de separație. Cu ajutorul unei pipete prevăzută cu pară de cauciuc se îndepărtează faza inferioară. Extractele sînt tratate apoi de două ori în același fel. Apoi proba și martorul se pun în baie de apă pentru îndepărtarea amestecului de extracție, iar etalonul, pentru îndepărtarea solventului.

Peste rezidiul uscat, format numai din tri-
gliceride, se adaugă:

	Probă	Martor	Etalon
	ml	ml	ml
Sol. de lucru de KOH	0,5	-	0,5
Alcool	-	0,5	-

Se agită pînă se solvă rezidiul și se ține timp de 15 minute la baie de apă la 60-70°C; se răcește și se adaugă:

Acid sulfuric	0,5	0,5	0,5
Apă bidistilată	0,5	0,5	0,5

Se agită din nou și se ține 15 minute la baie de apă care fierbe. Se răcește la un curent de

apă. Se adaugă câte 4 ml eter în fiecare eprubetă, se agită energic, iar după un repaus de 5 minute se îndepărtează prin aspirație faza eterică, iar urmele de eter pe baia de apă. În continuare se adaugă:

Periodat de potasiu	0,1	0,1	0,1
---------------------	-----	-----	-----

După agitare, colorația galbenă de iodură dispare în câteva minute. Dacă colorația dispare, se adaugă o nouă cantitate de periodat de potasiu, Se așteaptă 10 minute, după care se adaugă:

Arsenib de sodiu	0,1	0,1	0,1
------------------	-----	-----	-----

Acid cromotropic	5	5	5
------------------	---	---	---

Se agită și se ține 30 minute la baia de apă care fierbe, apoi se răcește la curent de apă.

Se citește la 570 nm extincția probei și etalonului față de martor.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 2 = \text{trigliceride în g \%}, \text{ exprimate în trioleină.}$$

Valori normale

Femei = 0,4 - 1,15 g %

Bărbați = 0,5 - 1,55 g %

Observații

In loc de arsenit de sodiu poate fi folosită și soluția de clorură stanoasă:

Staniu	0,1 g
HCl concentrat	2 ml
Sol. CuSO_4 4%	1 picătură

Se fierbe pînă la solvire completă a staniului, se completează cu apă bidistilată la 10 ml, se răcește. Dacă a mai rămas un depăzit, se decantează partea clară care constituie reactivul. Se conservă la întuneric și poate fi folosit numai 4-5 zile.

Toate operațiile trebuiesc efectuate în atmosferă lipsită de vapori de formol.

DOZAREA LECITINEI DIN SERPrincipiu

Fosfatidele din ser, împreună cu proteinele, sînt precipitate și separate de fosforul anorganic care rămîne în soluție. Precipitatul este distrus și se eliberează acidul fosforic care este dozat sub formă de complex fosfo-molibdic.

Reactivi

1. Acid percloric 70 %
2. Acid molidic

molibdat de amoniu 10 g
apă distilată pînă la 100 ml

Se amestecă pe gheață cu 100 ml de H_2SO_4 conc.

3. Fosfat acid de amoniu - soluție etalon

$NH_4H_2PO_4$ 4,4369 g
apă distilată pînă la 1000 ml

Din această soluție se ia 1 ml și se aduce cu apă distilată la 100 ml (soluția care se utilizează).

5 ml din această soluție corespund la 1,5 g lecitină.

4. Reactiv stanos

staniu 0,1 g
HCl conc. 2 ml

Se solvă la cald pe baie de apă și se completează la 10 ml cu apă distilată.

5. HNO_3 conc.

6. Acid triclor acetic 5 %

7. Sol. fenolftaleină 1 %

8. NaOH 40 %

9. NaOH 0,1 N

Modul de lucru

In trei eprubete de centrifugă se pipetează:

	Probă ml	Martor ml	Etalon ml
Ser	0,2	-	-
Acid tricloracetic	5	-	-

După 5 minute se centrifughează, se aruncă stratul superior și se folosește sedimentul pentru test.

Sediment	+	-	-
Etalon diluat	-	-	2,5
Apă distilată	-	1	-
Acid percloric	0,5	0,5	0,5
HNO ₃ - picături	3	3	3

Se suspendă precipitatul în acid percloric prin ușoară agitare.

Se introduc eprubetele într-o baie de ulei încălzită la 180°C și se menține această temperatură 15 minute. Se răcesc eprubetele la temperatura camerei. Lichidul trebuie să fie clar. Se neutralizează conținutul celor trei eprubete foarte exact cu NaOH 40 % și apoi NaOH N/10 în prezența fenolftaleinei până la viraj roz pal. Se aduce apoi conținutul eprubetelor în baloane cotate de 25 ml și se completează cu apă distilată până la semn. Se adaugă câte 1 ml acid molidic și 0,25 ml reactiv stanos. Se citește după 5 minute extincția probei și a etalonului față de martor la 570 nm.

Calcul

$$\frac{E_P - E_M}{E_E} \times 1,5 = \text{g lecitină la 1000 ml ser}$$

Valori normale

1,5 - 2,5 g la 1000 ml ser

DOZAREA LECITINEI DIN SERPrincipiu

Se extrag lipidele din ser cu amestec alcool-eter. Lecitina din lipide este distrusă cu amestec sulfonitric cu punerea în libertate a acidului fosforic care se dozează apoi ca un complex fosfo molibdenic.

Reactivi

1. Amestec alcool-eter

alcool 96°	30 ml
eter	10 ml

2. Eter

3. Acid azotic

4. Acid sulfuric

5. Sol. NaOH 40 %

6. Sol. fenolftaleină 1 %

7. Sol. etalon de fosfat acid de amoniu

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	4,4369 g
------------------------------------	----------

apă distilată pînă la	1000 ml
-----------------------	---------

Din această soluție se ia 1 ml și se aduce la 100 ml cu apă distilată.

5 ml din această soluție corespunde la 1,5 g lecitină %.

8. Reactiv sulfo - molibdic

Molibdat de amoniu	10 g
apă distilată pînă la	100 ml
acid sulfuric	100 ml.

Amestecul se face pe gheață.

9. NaOH 0,1 N

10. Reactiv stanos

staniu . 0,1 g

HCl conc. 2 ml

Se fierbe pe baie de apă pînă la completa solvire a staniului și se completează cu apă distilată la 10 ml, se răcește.

Modul de lucru

Într-un balon Erlenmeyer se iau 20 ml alcool - eter și se adaugă 1 ml ser picătură cu picătură agitînd continuu timp de 10 minute. Se ține pe baia de apă un minut și se filtrează pe filtru cantitativ, degresat în prealabil cu amestec alcool eter. În filtrat trec lipidele. Se spală balonul de două ori cu eter. Filtratul și eterul de spălare se aduc într-o capsulă de porțelan și se evaporă solventul. Se reia reziduul cu eter și se filtrează printr-o hîrtie degresată ca mai sus. Se spală de două ori capsula cu eter. Filtratul și eterul de spălare se aduc într-un balon Kjeldahl, Eterul se evaporă pe baie de apă pînă la siccitate.

Se distruge apoi molecula de lecitină cu punerea în libertate a acidului fosforic.

Pentru aceasta se introduce în balonul Kjeldahl 3 ml apă distilată, 1 ml HNO_3 , 1 ml H_2SO_4 conc., o perla de sticlă. Se fierbe. Cînd încep să se degaje vapori albi, se pune în gîtul balonului o pîlnie. Se continuă fierberea pînă la decolorarea completă a amestecului. Se lasă să se răcească. Pentru a transforma apoi acidul metafosforic în orto-

fosforic se adaugă 30 ml apă distilată și se fierbe conținutul balonului pînă ce volumul se reduce la 10 ml.

Dozarea fosforului

Intr-un balon cotat de 50 ml, se aduce cantitativ conținutul balonului Kjeldahl. Se adaugă o picătură de fenolftaleină și se neutralizează foarte exact pînă la roz pal, mai întîi cu o soluție de NaOH 40 % iar virajul se prinde cu o soluție de NaOH 0,1 N.

In alt balon cotat de 50 ml se iau 5 ml soluție etalon de fosfat, se adaugă 0,5 ml H_2SO_4 conc. și se neutralizează în prezență de fenolftaleină cu NaOH, ca mai sus. Se completează ambele baloane la 50 ml cu apă distilată. Se adaugă apoi în fiecare balon cîte 2 ml reactiv sulfo - molidic și 0,5 ml reactiv stanoș. Se agită. Se lasă în repaus după care se determină extincția probei și a etalonului față de apă distilată, la 570 nm.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 1,5 = \text{g lecitină la 1000 ml ser.}$$

Valori normale

1,5 g la 1000 ml ser.

Interpretare

Modificări ale metabolismului lipidic întâlnim în afecțiuni ca: ateroscleroza, hiperlipemie esențială, obezitate, diabet .

Sindromul umoral al aterosclerozei se manifestă în special prin perturbări ale metabolismului lipidic și anume: dereglarea metabolică a colesterolului, inversiunea raportului colesterol/fosfolipide și concentrația anormală de macromolecule complexe lipoproteice.

Media colesterolemiei prezintă o cifră semnificativ mai ridicată față de cea a cifrelor de la sănătoși; cifrele individuale sînt însă destul de ridicate. Lipemia se găsește asociată cu colesterolemia. Procentul cel mai ridicat al lipidelor totale se întâlnește în stadiul umoral preclinic, se menține procentual și față de stadiul clinic al bolii, fiind urmată de hipercolesterolemie.

Caracteristic este însă creșterea fracțiunii beta lipoproteinelor, fracțiune bogată în colesterol, față de fracțiunea alfa lipoproteică de care se leagă mai ales grăsimile neutre și mai puțin colesterolul și care prezintă tendință la scădere. Această anomalie de distribuție poate apărea fără să existe o modificare cantitativă a colesterolului. Creșterea trigliceridelor la tineri poate fi un indiciu de ateroscleroză mai semnificativ decît hipercolesterolemia.

Hiperlipemia esențială este un sindrom caracterizat prin creșterea grăsimilor neutre din ser sub formă de chilomicroni mai bogați în colesterol și fosfolipide decât cei normali. Aspectul lăptos clasic al serului este dat tocmai de prezența chilomicronilor. Colesterolul prezintă valori ridicate, în special fracțiunea liberă. Modificările colesterolului nu se produc paralel cu a grăsimilor neutre. Fosfolipidele prezintă valori ridicate, raportul colesterol / fosfolipide fiind crescut peste unitate. Testul Kunkel cu fenol este pozitiv.

În obezitate se constată creșterea constantelor biochimice legate de tulburări ale metabolismului lipidic. Există un paralelism între creșterea în greutate și creșterea colesterolului seric și a raportului beta / alfa - lipoproteine.

Diabetul are drept cauză primară dereglarea metabolismului glucidic și indirect a celui lipidic. Hiperlipemia este rezultatul mobilizării excesive a grăsimilor de depozit care încearcă fără să izbutească să suplinească lipsa de glucide iar hipercolesterolemia este rezultatul creșterii sintezei endogene a colesterolului. Creșterea cetogenezei hepatice și scăderea utilizării acestora de către țesuturile extrahepatice duce la apariția de corpi cetonici în urină, care se elimină sub formă de săruri; consumul de alcali este crescut ducând astfel la acidoză.

Tulburări ale metabolismului lipidic se întâlnesc de asemeni în boala canceroasă, hepatita virotică și icterul prin obstrucție.

TESTUL GORDIS SIMPLIFICAT (BIERMAN)

Principiu

Lipoproteinele cu greutate moleculară mică sînt separate prin gradient de densitate.

Reactivi

1. Sol. apoasă de polivinil-pirolidonă 3 % (PVP)

Modul de lucru

Intr-o eprubetă se introduc:

Soluție polivinil-pirolidonă	10 - 15 ml
Plasmă	0,5 ml

Plasma se introduce la fundul eprubetei cu ajutorul unei pipete efilate.

Se lasă în repaus 16 ore la 37°C după care se citește rezultatul.

Rezultat

- supernatant clar = plasmă normală
- pătură lăptoasă la suprafața PVP = particule primare
- supernatant tulbure = particule secundare.

Observații

Tehnica lui Gordis utilizează un gradient de PVP de 0 - 5 %. Tehnica modificată este mult mai sensibilă, rezultatele obținute fiind identice.

Plasma se utilizează proaspăt recoltată.

DETERMINAREA CORPILOR CETONICI.Principiu

Corpii cetonici, datorită grupării carbonil, reacționează cu bisulfitul de sodiu. Excesul de bisulfid este îndepărtat prin tratare cu iod. Complexul format (corpi cetonici- bisulfid) este descompus prin tratare cu bicarbonat, iar bisulfitul eliberat este titrat cu iod.

Reactivi

1. Acid acetic diluat
2. Sol. bisulfid de sodiu 1 %
3. Sol. amidon indicator
4. Sol. iod N/10
5. Sol. iod N/100
6. Sol. saturată de bicarbonat de sodiu

Modul de lucru

Intr-un balon Erlenmeyer de 150 - 200 ml se introduce 1 ml urină proaspătă și 20 ml apă distilată. Se aduce pH-ul la valori cuprinse între 2-4 prin acidifiere cu acid acetic(sau acid clorhidric) diluat. Se adaugă 5 ml soluție de bisulfid de sodiu și se așteaptă 15 minute pentru fixarea grupelor carbonil. Se adaugă 1 ml soluție amidon și se îndepărtează excesul de bisulfid prin adăugare de iod N/10 la început până apare culoarea albastră și apoi adăugare de iod N/100 până când colorația albastră persistă.

Se adaugă 5 ml soluție saturată de bicarbonat de sodiu care descompune complexul corpi ceto-

nici - bisulfite). Bisulfitul eliberat se titrează cu soluție de iod N/100 pînă la colorația albastră care persistă 10 - 15 secunde.

Calcul

1 ml iod n/100 corespunde la 0,44 mg acid piruvic

Numărul de ml (n) din soluția de iod N/100 utilizați la ultima titrare se înmulțește cu 0,44 și se obține cantitatea de corpi cetonici exprimată în mg de acid piruvic dintr-un ml de urină.

Valori normale

316 mg ‰ ml urină cu oscilații între 125 - 381 mg ‰

Interpretare

Testul eliminării corpurilor cetonice este utilizat în afecțiunile hepatice, ciroze, ficat cardiac. Cantitatea este crescută în funcție de gradul leziunii.

P R O T I D E

DOZAREA PROTEINELOR DIN SER PRIN
REFRACTOMETRIEPrincipiu

După Reiss, indicele de refracție al serului depinde de concentrația sa în proteine.

Modul de lucru

Cel mai utilizat tip de refractometru este refractometrul Abbé. Raza de lumină, venită prin oglindă, ajunge la prismă, care este formată din două jumătăți, între care se găsește substanța de analizat, întinsă într-un strat uniform.

Prin rotirea prisme se obține reflexia interioară totală a luminii de suprafața stratului substanței analizate.

Acest moment este indicat în ocularul aparatului, prin separarea netă a două câmpuri, unul luminat, altul complet întunecat, ceea ce reprezintă o dispersie a luminii în substanța cercetată și în prisme, egală și de sens contrar. Când linia de separare a celor două câmpuri apare perfect delimitată și la mijlocul ocularului, se citește gradația respectivă pe scara aparatului.

Înainte de determinările refractometrice, trebuie verificat aparatul, determinând indicele de refracție a apei distilate, care la 20° C trebuie

să fie egal cu 1,33300.

Cînd se fac determinări refractometrice se întrebuintează întotdeauna băi Hoepler, care să mențină constantă temperatura substanței de analizat și temperatura la care a fost reglat aparatul.

Pentru a determina concentrația proteinelor prin această metodă se pune o picătură de ser între prismele aparatului și determinînd pe n (indicele de refracție), găsim direct și rapid concentrația proteinelor serice.

Dăm mai jos tabelul lui Reiss (tabelul 2) indicînd concentrația proteinelor din ser, transudate și exsudate, în funcție de n pentru temperatura de $17,5^{\circ}\text{C}$.

Determinarea proteinelor prin această metodă, mai ales la serurile opalescente, poate da erori apreciabile.

Tabelul 2

Concentrația proteinelor în funcție de indicele de refracție pentru temperatura de $17,5^{\circ}\text{C}$

n $17,5^{\circ}\text{C}$	Concentrația proteinelor	
	serice(g ‰)	din exudate și transudate (g ‰)
1,34463	50,3	48,9
1,34500	52,5	51,0
1,34537	54,7	53,0
1,34575	56,8	55,0

1,34612	59,0	57,0
1,34650	61,2	59,0
1,34687	63,4	61,1
1,34724	65,5	63,1
1,34761	67,7	65,1
1,34798	69,8	67,1
1,34836	72,0	69,1
1,34873	74,2	71,2
1,34910	76,9	73,2
1,34947	78,5	75,2
1,34984	80,6	77,2
1,35021	82,8	79,2
1,35058	84,9	81,2
1,35095	87,1	83,2
1,35132	89,2	85,2
1,35169	91,4	87,2
1,35205	93,5	89,2
1,35242	95,7	91,2

DOZAREA PROTEINELOR DIN SER PRIN METODA

AZOTOMETRICA

(Metoda Pregl-Parnas-Wagner)

Principiu

Acidul sulfuric concentrat cu sulfatul de cupru și sulfatul de potasiu acționează ca oxidant și distrug materiile organice. Carbonul, hidrogenul și oxigenul se îndepărtează sub formă de CO_2 și H_2O ,

iar azotul este fixat sub formă de sulfat de amoniu. Amoniacul din sulfatul de amoniu este distilat în mediu puternic alcalin și fixat într-un exces de acid sulfuric exact titrat.

Prin diferență, cunoscând cantitatea de acid sulfuric neneutralizat de către amoniacul distilat, se poate cunoaște cantitatea de amoniac și deci aceea de azot.

Reactivi

1. Acid sulfuric concentrat
2. Sulfat de cupru cristale
3. Sulfat de potasiu cristale
4. Sol. hidroxid de potasiu 40 %
5. Sol. acid sulfuric N/100
6. Sol. hidroxid de sodiu N/100
7. Sol. fenolftaleină
8. Sol. roșu de metil 0,25 g %

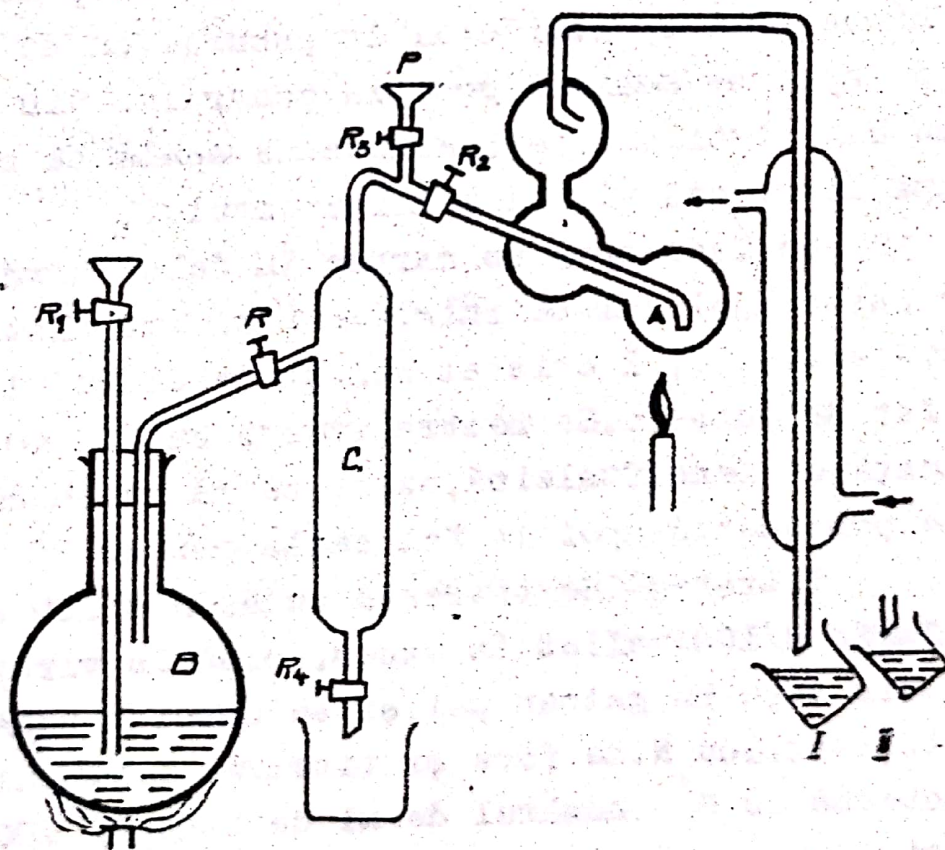
Modul de lucru

Distrugerea materiei organice- Într-un balon Kjeldahl se introduc 1 ml apă distilată, 0,1 ml plasmă, 1 ml acid sulfuric concentrat, 1 cristal de sulfat de cupru și 1 cristal de sulfat de potasiu.

Este necesar să se facă două probe. Se distruge materia organică la o sobă de combustie. Distrugerea este totală, atunci când în balon apare culoarea albastră a sulfatului de cupru, când azotul în totalitate a trecut în stare de amoniac, care cu acidul sulfuric a format sulfatul de amoniu.

Distilarea amoniacului- Se deschide robinetul R și R_4 și se închide robinetul R_2 . Se încălzește apa din balonul B, ce servește drept generator de vapori de apă, pentru antrenarea amoniacului.

Vaporii se evacuează prin rezervorul intermediar C și robinetul R_4 . Intr-un pahar se măsoară 10 ml din soluția de acid sulfuric N/100 și paharul se așează în poziția I. Se introduc 5 picături din soluția de roșu de metil.



Se deschide robinetul R_3 și se aduce conținutul balonului Kjeldahl, în care s-a făcut distrugerea, în pîlnia P. Conținutul ajunge astfel la balonul A. Se clătește balonul Kjeldahl cu apă bidistilată, care de asemenea se aduce în pîlnia P și de acolo în balonul A. Se introduce apoi cîteva picături de fenolftaleină și se adaugă KOH 40 % pînă la viraj roz. Se închide robinetul R_3 și se lasă să circule în refrigerent apă cît mai rece. Se încălzește balonul A. Se închide robinetul R_4 și se deschide robinetul R_2 , observîndu-se ca în balonul A să barboteze vapori de apă din generatorul B. Se distilă timp de 10 minute și se prinde distilatul în paharul cu acid sulfuric; apoi se schimbă poziția paharului din I în II și se mai distilă cîteva minute. Se spală cu cîteva ml de apă distilată vârful refrigerentului.

Se face apoi un martor în felul următor: într-un balon Kjeldahl se introduc 1 ml apă distilată 1 ml acid sulfuric, 1 cristal sulfat de cupru, 1 cristal sulfat de potasiu. Se neutralizează cu KOH 40 %, în prezență de fenolftaleină, exact ca la proba cu sînge. Se procedează apoi la fel ca la probă.

Titrarea- Se titrează cu NaOH N/100 acidul sulfuric N/100 aflat în exces, pînă la virarea culorii din roșu în galben pai, și se notează numărul de ml utilizați cu N. Se face și titrarea martorului și se notează cu N' numărul de ml de NaOH N/100 utilizați.

Calcul

$$(N' - N) \times 14 = \text{g azot la } 1000 \text{ ml ser}$$

Pentru a transforma în g proteine se înmulțește cu 6,25.

DOZAREA PROTEINELOR PRIN REACTIA BIURETULUIPrincipiu

Proteinele, datorită structurii legăturii peptidice, cu sulfatul de cupru dau săruri complexe de culoare violetă care se fotometrează.

Reactivi

1. Reactiv biuret

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,235 g
Tartrat dublu de Na și K	0,94 g
NaOH	4,60 g
Apă distilată până la	100 ml

2. Sol. NaCl 9 g‰

Modul de lucru

In două eprubete se pipetează:

	Probă	Martor
	ml.	ml
NaCl	0,9	1
Ser	0,1	-
Reactiv biuret	4	4

Se agită ambele eprubete și se lasă în re-

paus 20' la întuneric după care se fotometrează proba la 530 nm cu o cuvă de 1 cm grosime de strat față de martor.

Determinarea concentrației în g de proteine la ‰ se face prin raportarea extincției obținute la o curbă etalon stabilită în prealabil.

Curba se construiește dintr-un ser a cărui concentrație în proteine totale a fost determinat prin metoda azotometrică, Parnas-Wagner.

Se stabilesc 4 puncte astfel:

	1	2	3	4	M
	ml	ml	ml	ml	ml
Ser	0,025	0,05	0,1	0,15	-
Ser fiziologic	0,975	0,95	0,9	0,85	1
Reactiv biuret	4	4	4	4	4

Se agită. Se lasă în repaus 20', apoi se fotometrează față de martor.

Extincțiile obținute pentru fiecare probă sînt trecute pe ordonată iar pe abscisă g proteine la ‰.

DOZAREA GRAVIMETRICA A FIBRINOGENULUI (Metoda Forster și Whipple)

Principiu

Fibrinogenul este precipitat sub formă de fibrină cu clorură de calciu. Precipitatul spălat și uscat este cîntărit.

Reactivi1. Sol. coagulantă

CaCl_2 p.a.sic.	1,25 g
NaCl	8 g
apă distilată la	1000 ml

Modul de lucru

Intr-un cilindru gradat de 250 ml se introduce 100 ml soluție coagulantă și apoi se adaugă picătură cu picătură 5 ml plasmă oxalatată proaspăt recoltată, agitând mereu cu o baghetă de sticlă.

Se lasă 3 ore la temperatura camerei. (18-20°C) timp în care se formează chiagul de fibrină.

Se desprinde chiagul de pe pereții cilindrului și se filtrează prin 2 filtre tarate, puse unul peste altul, și se spală chiagul de fibrină de mai multe ori cu apă distilată, până când apa de spălare nu mai conține clor (se încearcă cu soluție de AgNO_3)

Se pun filtrele cu chiagul pe o sticlă de ceas și se usucă la 110°C timp de 6 ore. Se răcesc într-un exicator și se cântăresc punând filtrul cu chiag pe un platan al balanței, iar filtrul simplu pe celălalt platan. Diferența de greutate se notează cu G.

Calcul

$$G \times 200 = \text{g fibrinogen la } 1000 \text{ ml plasmă}$$

Valori normale

2,5 - 5 g fibrinogen la 1000 ml plasmă

DOZAREA COLORIMETRICA A FIBRINOGENULUI

Principiu

Fibrinogenul din plasmă este coagulat cu clorură de calciu, iar fibrina astfel formată este dozată prin reacția biuretului.

Reactivi

1. Sol. coagulantă

CaCl ₂ sic.	1,25 g
NaCl	8 g
Apă distilată pînă la	1000 ml

2. Sol. NaOH 1 M

3. Sol. NaCl 9 g ‰

4. Reactiv biuret

CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,5 g
Tartrat de Na și K	6,0 g
NaOH	30,0 g
KJ	1,0 g
Apă distilată pînă la	1000 ml

5. Sol. etalon albumină 4 g ‰

Modul de lucru

La 5 ml sol. coagulantă ținută 5 minute la 37°C, se adaugă picătură cu picătură 0,5 ml plasmă, se agită, se lasă la baie de apă la 37°C timp de 10 minute.

Se desprinde apoi chiagul de pe pereții eprubetei prin agitare sau cu o baghetă. Se adaugă 5 ml soluție NaCl se agită din nou, se centrifughează timp de 10 minute la 5000 t/m după care se îndepărtează supernatantul. Se mai adaugă 2 ml soluție NaCl

pentru spălarea chiagului. Se rulează chiagul pe o baghetă de sticlă, se usucă pe hîrtie de filtru și se face apoi dozarea colorimetrică:

	Probă	Etalon	Martor
	ml	ml	ml
	chiag	-	-
NaOH 1 M	1	-	-

Se ține 10 minute la baie de apă de 60-70°C pentru disolvarea chiagului apoi se răcește.

Sol. etalon	-	0,5	-
NaCl	-	0,5	1
Reactiv biuret	3	3	3

După 30 minute se citesc extincțiile probei și etalonului față de martor la 530 - 550 nm.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 4 = \text{g fibrinogen la 1000 ml plasmă}$$

Valori normale

3,5 - 5,5 g fibrinogen la 1000 ml plasmă

Interpretare

Hipofibrinogenemiile caracterizate prin valori sub 2 g la ‰, se întîlnesc în hepatopatii severe (hepatite, ciroze), hemopatii (leucoze acute, în special cu promielocite), sindroamele de proteoliză acută prin coagulare diseminată intravasculară sau prin activare primară a fibrinolizei (afecțiuni distructive ale plămînilor, uterului, prostatei, neoplasme)

De asemenea, pot exista afibrinogenemii

congenitale datorită unui defect enzimatic.

Hiperfibrinogenemiile caracterizate prin valori ale fibrinogenului de peste 5,5 g % se întâlnesc în infecții acute localizate sau generalizate, anumite hemopatii (Hodgkin, sarcomatoză, nefrite cronice, stări post operatorii)

DOZAREA UREEI ÎN SINGE SI URINA

(Metoda cu urează)

Principiu

Ureea, sub acțiunea ureazei este hidrolizată și transformată în carbonat de amoniu, care în prezența fenolului și a hipocloritului de sodiu dă o culoare albastră (reacția Berthelot).

Reactivi

1. Sol. tampon fosfat M/15 pH=7

2. Sol. urează tamponată

Ureea	0,1 g
Apă bidistilată	49 ml
Tampon fosfat	1 ml

Soluția se prepară proaspătă.

3. Reactiv fenol

Fenol recristalizat	50 g
Natriu nitroprusic	0,25 g
Apă bidistilată pînă la	1000 ml

4. Reactiv hipoclorit

Hidroxid de sodiu	25 g
Hipoclorit de sodiu 15%	2,2 g
Apă bidistilată pînă la	1000 ml

Soluția se conservă în sticlă brună la $+4^{\circ}\text{C}$. timp de o lună.

5. Sol. etalon uree 300 mg %

În momentul întrebuințării se diluiază 1/10. Um ml din această soluție conține 0,03 mg.

6. Apă bidistilată fără amoniac

La 2 litri apă distilată se adaugă 1,2 ml permanganat de potasiu 1% și 0,25 ml acid sulfuric 4 N și se redistilă în instalație de sticlă neutră.

Modul de lucru

Se diluiază serul 1/10, iar urina 1/1000 cu ser fiziologic.

În trei eprubete se pipetează:

	Proba	Etalon	Martor
	ml	ml	ml
Sol. urează	1	1	1
Ser sau urină diluată	0,2	-	-
Etalon uree 0,03 mg/ml	-	0,2	-
Apă bidistilată	-	-	0,2

Se agită și se ține timp de 15 minute în baie de apă la 37°C , după care se răcește la un curent de apă.

Reactiv fenol	1	1	1
Reactiv hipoclorit	1	1	1

Se agită și se lasă să stea la întuneric 30 minute, se completează cu apă bidistilată până la 10 ml și se citesc extincțiile probei și etalomului față de martor la 530 - 590 nm (550 nm cel mai indicat).

Calcul

Pentru ser:

$$\frac{E_P}{E_E} \times 0,3 = \text{g uree \% ml ser}$$

Pentru urină:

$$\frac{E_P}{E_E} \times 30 = \text{g uree \% ml urină}$$

Valori normale

Ser: 0,18 - 0,50 g %

Urină: 20 - 35 g/ 24 ore.

Observații

Peste o concentrație de 0,7 g uree %, legea Lambert - Beer nu mai este respectată și este necesar de a se dilua suplimentar produsul de analizat.

Este necesară evitarea contaminării cu urmele de amoniac din atmosferă.

DOZAREA UREEI IN SINGE SI URINA

(Micrometoda Ambard)

Principiu

In mediu alcalin, ureea este degradată de către hipobromit cu formare de azot, apă și bioxid de carbon. Bioxidul de carbon este fixat de hidroxidul de sodiu sub formă de carbonat de sodiu. Azotul dega-

jat este cules sub apă într-un tub colector și raportat la volumul de azot rezultat dintr-o soluție etalon de uree.

Reactivi

1. Sol. acid tricloracetic 20 %
2. Sol. etalon uree 0,05 g %
3. Sol. hipobromit

brom	3 ml
Sol. NaOH 33 %	100 ml

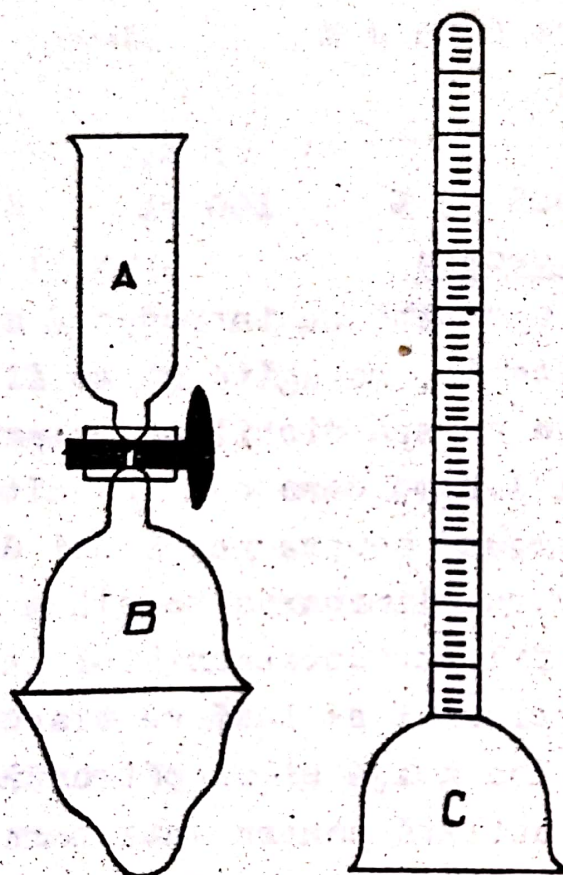
Modul de procedare

Intr-o eprubetă se introduc 2 ml ser și 2 ml acid tricloracetic, se agită și se filtrează.

Se umple cu apă distilată rezervorul inferior al aparatului Ambard care conține câteva perle de sticlă. Se manevrează asupra porțiunii de cauciuc a rezervorului pentru eliminarea totală a aerului. Se introduce 2 ml filtrat (corespunzător la 1 ml ser) în rezervorul superior și se lasă să treacă în rezervorul inferior, avînd grijă să nu pătrundă aer. Se mai adaugă 1 ml apă distilată pentru antrenarea resturilor de filtrat. Se introduc apoi în rezervorul superior 1,5 ml hipobromit, din care 1 ml se trece în rezervorul inferior, restul de 0,5 ml ne asigură că în rezervor nu a pătruns aer. Se agită 3 minute, timp în care are loc reacția de descompunere a ureei.

Se umple tubul colector cu apă eliminînd aerul cu ajutorul unui pai care va rămîne în tub. Se introduce aparatul Ambard în apă și după umplerea rezervorului superior cu lichid, se aduce în clopo-

tul tubului colector. Se deschide robinetul și se manevrează porțiunea de cauciuc a rezervorului inferior, antrenându-se astfel azotul în clopotul tubului colector. Se manevrează paiul pînă ce azotul din clo-



pot trece în tubul gradat al colectorului. Se îndepărtează paiul, se scoate tubul colector din apă și se citește volumul de azot degajat.

Se spală aparatul cu apă și se repetă operațiile cu 1 ml soluție etalon uree.

Calcul

Se notează cu V volumul de azot degajat

de ureea din 2 ml filtrat și cu V' volumul de azot degajat din ureea dintr-un ml soluție etalon.

$$\begin{array}{l} \text{Dacă } V' \dots\dots\dots 0,0005 \text{ g uree} \\ V \dots\dots\dots X \end{array}$$

$$X = \frac{V}{V'} \cdot 0,0005 \cdot 1000 = \text{g uree } \% \text{ ml ser.}$$

Valori normale

Ser: 0,30 - 0,50 g %

Urină: 20 - 25 g %.

Observații

Pentru dozarea ureei în urină, tehnica este identică cu diferența:

- Se utilizează 0,1 ml urină măsurată cu micropipeta.

- Urina nu se defecă decât în cazul când conține albumină.

- Prin metoda cu hipobromit se dozează atât azotul ureic cât și cel provenit din acidul uric, acizi aminați, creatină, etc., adică constituenții azotului rezidual.

Interpretare

Concentrația ureei este influențată de o serie de factori fiziologici printre care și vîrsta; sugarii prezintă o concentrație de 0,15 g %, iar copii 0,25 g % ml ser.

Alimentația bogată în proteine poate ridica valoarea ureei peste limita superioară.

Patologic, creșterea ureei în sînge peste limita superioară normală (azotemie) poate fi de origine renală sau extrarenală.

Azotemia renală se întîlnește în glomerulonefrita cronică și acută, nefroangioscleroza benignă sau malignă, nefropatiile tubulare toxice, tuberculoză renală, tumori renale, rinichi polichistice, hidronefroze, hipertrofie de prostată, calculoză, și alte obstacole mecanice.

Azotemia extrarenală corespunde unui hiper-catabolism proteic, avînd însă obligatoriu o componentă renală de origine ischemică.

Dozarea ureei în urină nu are semnificație clinică la subiecții normali, deoarece prezintă variații mari în funcție de regimul alimentar.

La bolnavii cu insuficiențe renale acute sau cronice ea este utilă permițînd aprecierea gradului de lezare a parenchimului renal.

DOZAREA CREATININEI ÎN SÎNGE

Principiu

Creatinina, în mediu alcalin, reduce acidul picric în acid picramic de culoare roșie (reacția lui Jaffé).

Reactivi

1. Sol. saturată de acid picric 1,2 g %
2. Sol. hidroxid de sodiu 10 %

Camera de lucru trebuie să fie lipsită de surse de amoniac.

Sîngele pentru dozare se recoltează într-o eprubetă de centrifugă, sub oleu de vaselină și în prezența heparinei (1 mg heparină la 5 ml sînge). Eprubeta este păstrată la rece pînă în momentul prelucrării (centrifugare la 2500 t/m timp de 5 minute pentru separarea plasmei) și a dozării amoniacului. Timpul nu trebuie să depășească două ore.

Se poate pregăti soluția pentru reacția de culoare astfel:

apă bidistilată	2 ml
fenolat de sodiu	1 ml
nitroprusiat de sodiu	1 ml

După ce s-a terminat difuziunea se introduce tija în acest amestec, după care se adaugă 1 ml tampon hipoclorit. Se completează cu apă bidistilată pînă la 10 ml și se procedează mai departe ca mai sus.

În loc de bicarbonat de potasiu se poate folosi soluție saturată de carbonat de sodiu din care se folosește 1 ml pentru fiecare dozare.

Culoarea este stabilă 24 ore.

Interpretare

Amoniemia este crescută în cirozele cu ascită, comă hepatică și insuficiențe hepatice grave. Sîngele conservat, prin învechire se îmbogățește în amoniac ca urmare a degradării compușilor amoniogeni (glutamină, metil-guanidină, acid adenilic, etc.), acesta nefiind indicat pentru transfuzii în maladiile citate.

DOZAREA ACIDULUI URIC DIN SER
(Metoda Grigaut - Laudat)

Principiu

Acidul uric reduce fosfo-wolframatul, care în mediu alcalin dă o culoare albastră.

Reactivi

1. Sol. acid tricloracetic 20 g %
2. Sol. fosfo-wolframică

Se aduce într-un balon de 1000 ml, 100 g de wolfram de sodiu, 80 ml acid fosforic ($d=60^{\circ}B$) și 700 ml apă distilată. Se fierbe cu refrigerent ascendent, timp de 2 ore și după răcire se completează cu apă distilată la 1000 ml.

3. Sol. etalon de acid uric:

sol. A	fosfat acid de sodiu	0,25 g
	fosfat disodic	2,25 g
	apă distilată fierbinte pînă la 250ml	
sol. B	acid uric	0,025 g
	apă distilată	5 ml
sol. C	acid tricloracetic 20 g %	

Se adaugă soluția A fierbinte peste soluția B, se adaugă 245 ml apă distilată. Se răcește și se completează la 1000 ml cu soluția C.

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de centrifugă se măsoară 2 ml ser. Se adaugă 2 ml acid tricloracetic, se amestecă bine cu o baghetă, se lasă în repaus 5 minute și se centrifughează.

In următoarele eprubete de reacție se pipetează:

	Probă	Etalon	Martor
	ml	ml	ml
Filtrat	2	-	-
Etalon	-	2	-
Carbonat de sodiu	2	2	2
Apă distilată	5,7	5,7	7,7
Fosfo-wolframat	0,3	0,3	0,3

Se agită și se lasă în repaus 5 minute și apoi se fotometrează imediat.

Se citește extincția probei și a etalonului față de martor la 630 nm.

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 0,05 = \text{g acid uric la } 1000 \text{ ml ser.}$$

Valori normale

0,04 - 0,05 g acid uric la 100 ml ser.

Observații

Trebuie să se evite precipitarea martorului, care ar duce la falsificarea rezultatelor.

In locul reactivului Folin - Wu poate fi folosit reactivul Folin - Ciocîlteu, 0,3 ml dintr-o soluție 1 : 3.

DOZAREA ACIDULUI URIC IN URINA
(Metoda Ronchese)

Principiu

Acidul uric din urină este precipitat sub formă de urat de amoniu, cu soluție amoniacală de clorură de amoniu. Uratul de amoniu prin tratare cu acid acetic, pune în libertate acidul uric care se titrează iodometric.

Reactivi

1. Sol. Ronchesse

amoniac	150 ml
clorură de amoniu	15 g
apă distilată	1000 ml

2. Amoniac concentrat

3. Clorură de amoniu, cristale

4. Sol. iod N/10

5. Sol. borax și bicarbonat de sodiu

Se face separat o soluție saturată de bicarbonat de sodiu și o soluție de borax. Se amestecă în părți egale.

Modul de lucru

Dacă urina prezintă un depozit trebuie făcută omogenă prin agitare și apoi alcalinizată cu amoniac pentru a se solvi toți compușii urici. Din urina astfel omogenizată se iau:

urină	10 ml
amoniac	1,5 ml
clorură de amoniu cristale	1,5 g

Se agită, se lasă în repaus 30 minute și se filtrează. Hîrtia de filtru cu precipitatul se întinde pe peretele interior al unui pahar conic, cu precipitatul înspre interiorul paharului. Cu un jet de apă puternic se desprinde uratul de amoniu de pe hîrtia de filtru. Se pot utiliza pentru această operație pînă la 100 ml apă distilată.

Se trece apoi uratul de amoniu în acid uric. Pentru aceasta se introduce în paharul conic o bucătică de hîrtie de turnesol albastră ce servește ca indicator și apoi acid acetic pînă la o reacție acidă, pînă cînd hîrtia de turnesol din albastră devine roșie.

Pentru a titra acidul uric se introduce în pahar soluție de borax și bicarbonat pînă la colorarea din nou a hîrtiei de turnesol în albastru. Se adaugă apoi două picături din soluția de amidon și se titrează cu iod pînă la culoare albastră. Se notează numărul de ml din soluția de iod utilizați, N.

Calcul

$N \times 0,84 = \text{g acid uric la } 1000 \text{ ml urină.}$

Valori normale

0,4 - 0,07 g acid uric la 1000 ml urină.

Observații

La rezultat se adugă 0,01g care reprezintă un factor de corecție.

Cînd cantitatea de acid uric astfel titrat este mai mică decît 0,1 g %, se precipită acidul uric cu o cantitate dublă de clorură de amoniu și se lasă în repaus 24 ore.

Nu se titrează direct acidul uric cu iod, așa cum se găsește în urină, deoarece în urină se mai găsesc și alte compuși care pot reacționa cu iodul.

Interpretare

Acidul uric la om reprezintă termemul final al catabolismului oxidativ al bazelor purinice.

Creșterea concentrației sanguine a acidului uric, hiperuricemia, se produce prin două mecanisme:

1. prin catabolism exagerat al nucleoproteinelor endogene, întîlnit în leucemii acute și cronice, pneumonii în faza de rezoluție, intoxicații cu plumb și mercur, arsuri întinse, toxicoze gravidice;

2. prin defect de eliminare, ca în insuficiența cardiacă, adenom de prostată, nefrite.

Supraîncărcarea cu acid uric a țesuturilor la gutoși, determină constant hiperuricemie, în general între 0,07 și 0,09 g %.

În urina unui subiect normal cu alimentație mixtă se elimină în medie 0,4 - 0,7 g % acid uric în parte sub formă de acid, în parte sub formă de urat alcalin.

Acidul uric excretat are o dublă sursă: exogenă, alimentară, datorită compușilor purinici și

endogenă prin catabolizarea nucleoproteinelor celulare. Chiar dacă subiectul este supus unui regim complet lipsit de purine, urina continuă să conțină o cantitate apreciabilă, care poate varia de la 0,3 la 0,7 g % și rămâne constantă pentru fiecare subiect.

Există uneori eliminări crescute urinare de acid uric în diverse afecțiuni, caracterizate prin distrugeri celulare importante, ca în leucemii, unde se poate ajunge la 5 g pe zi. În gută, bruscă descărcare de acid uric în urină corespunde de cele mai multe ori cu creșterea depunerilor în capilare și cu declanșarea crizei dureroase.

Scleroza renală din guta cronică duce la retenția acidului uric, la creșterea uricemiei.

TESTE DE DISPROTEINEMIE

Disproteinemie, reprezintă termenul prin care se înțelege o modificare calitativă și cantitativă a proteinelor sanguine, secundar unui mecanism fiziopatologic declanșat de o anumită afecțiune, fiind deci expresia incapacității organismului de a menține constante și în limite normale, fracțiunile proteinelor sale.

În cursul disproteinemiilor s-au putut pune în evidență proteine străine sîngelui normal, numite paraproteine. Prin paraproteinemie se înțelege momentul apariției proteinelor anormale. Cele două

noțiuni trebuie subordonate una alteia, întrucât nu există paraproteinemie fără disproteinemie și fiecare disproteinemie este însoțită de apariția paraproteinelor.

Opus stării de disproteinemie este euproteinemia, prin care se înțelege echilibrul dinamic normal al proteinelor sanguine.

Prin testele de disproteinemie, teste de labilitate serică sau reacții de floclulare, se înțelege un ansamblu de reacții care se traduc prin apariția unei turbidități, sau a unei floclări după adăugarea la ser a diferiților reactivi, ca urmare a dezechilibrului calitativ și cantitativ al diferitelor fracțiuni proteice. El poate fi rezultatul diminuării unor factori stabilizanți (albumine), sau creșterii unor factori precipitanți (γ -globuline).

Această labilitate particulară a serului poate fi pusă în evidență prin diluția serului, diminuând astfel forța ionică a mediului, creșterea tendinței la precipitare prin adăugarea de ioni bivalenți, adăugarea unei substanțe de natură coloidală susceptibilă ea însăși de a floclula, ca urmare a unei repartiții anormale a sarcinilor electrice a proteinelor și în fine adăugarea unei substanțe organice care realizează legături cu proteinele precipitate.

Pentru reacțiile de floclurare se poate utiliza următoarea serie de reacții:

<u>Flocularea serului</u>	<u>Reactivi</u>	<u>Testul de labilitate</u>
Săruri ale metalelor grele	HgCl ₂	Takata - Ara
	HgCl ₂	Gross - variantă volumetrică
	CaCl ₂	Weltman - banda de coagulare
	CdSO ₄	Kunkel
	CdSO ₄	Wunderly
Substanțe organice	formol	Gaté - gelificare
	fenol	Kunkel
	timol	Mc Lagan
Suspensii coloidale electronegative	cefa-	Hanger
	lină	
	coles-	
	terol	
Diminuarea conținutului în săruri	apă	Sia - Iagnov
	distilată	

TESTUL TAKATA - ARA

Principiu

Clorura mercurică cu carbonatul de sodiu dă o soluție coloidală de oxid de mercur, care cu fuxina bazică dă o colorație violetă. Serinele acționează ca un coloid de protecție, spre deosebire de globuline care nu joacă acest rol. Serul normal menține stabilitatea coloidului, chiar când serul este în

cantitate mică. Dacă echilibrul este deplasat spre globuline, se produce flocularea și apariția unor Takata - proteine.

Reactivi

1. Sol. clorură de sodiu 8,5 g %
2. Sol. clorură mercurică 5 g %
3. Sol. carbonat de sodiu anhidru 10 g %
4. Sol. fuxină bazică 0,2 g %

Modul de lucru

Se iau 7 eprubete de același diametru, se numerează și se introduc apoi în fiecare câte un ml din soluția de NaCl. Apoi, în prima eprubetă se introduce 1 ml ser și se agită. Din prima eprubetă se ia 1 ml și se introduce în a doua, se agită. Din a doua eprubetă se ia 1 ml și se introduce în a treia și așa mai departe. Din ultima se aruncă 1 ml. Se obțin astfel diluțiile:

Eprubeta	1	2	3	4	5	6	7
Diluția	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128

Se introduc apoi în fiecare eprubetă câte 0,25 ml din soluția de carbonat de sodiu. Se face apoi un amestec de părți egale din soluția de fuxină și din soluția de clorură mercurică. Din acest amestec se introduc în fiecare eprubetă câte 0,3 ml. Se lasă 24 ore la temperatura camerei și apoi se citește rezultatul.

Calcul

Reacția este pozitivă când flocularea se constată în trei eprubete consecutive.

Gradul de pozitivitate al reacției este ,
cu atît mai mare, cu cît floclarea apare mai devreme.

Observații

Creșterea temperaturii mediului negativează reacția, de asemenea glucoza care dizolvă precipitatele (atenție la diabetici). Ureea favorizează pozitivitatea reacției (atenție la nefritici). Atebrina și sulfonatul pozitivează reacția.

Interpretare

Reacția este pozitivă în ciroze și în insuficiențele hepatice. Se observă de asemenea în cancerul hepatic.

TESTUL GROSS

Principiu

Este asemănător cu al reacției Takata. Precipitarea nu se face în mediu neizotonic ca la reacția Takata, ci într-un mediu izotonic realizat prin soluția Hayem.

Reactivi

1. Reactiv Hayem

clorură mercurică	0,5 g
clorur de sodiu	2 g
sulfat de sodiu cristalizat	5 g
apă distilată pînă la	200 ml

Modul de lucru

Se ia într-o eprubetă 1 ml ser și se ti-

trează cu reactiv Hayem. După adăugarea fiecărei picături se agită eprubeta. Se notează cantitatea de reactiv Hayem necesară pentru a obține un precipitat alburiu ca un nor, care se ridică și dispare prin agitare. Aceasta este limita inferioară a floculării. Se continuă cu titrarea pînă la floculare ireversibilă.

Calcul

Normal, limita inferioară a floculării este peste 1,2 ml (floculare reversibilă), iar limita floculării ireversibile este peste 2 ml. Valori mai mici indică perturbarea reacției.

Interpretare

Se consideră ca un test pentru leziuni parenchimatoase.

TESTUL KUNKEL

Principiu

Proteinele și în special γ -globulinele precipită în soluții cu o concentrație ionică mică.

Reactivi

1. Sol. sulfat de zinc tamponată la pH 7,2

acid barbituric	0,28 g
barbiturat de sodiu	0,21 g
sulfat de zinc cristalizat	0,024 g
apă distilată pînă la	1000 ml
2. Sol. NaCl 8,5 g ‰

se
sc

cu
tu
At
..e

di
da
vi
te

Modul de lucru

In două eprubete se introduc:

	Probă	Martor
	ml	ml
soluție ZnSO_4	3	-
soluție NaCl	-	3
ser	0,05	0,05

Se agită, se lasă în repaus 30 minute și se citește opacitatea probei față de a martorului pe scara absorbției la 470 nm.

Calcul

loo - numărul gradațiilor = turbiditatea

Valori normale

Turbiditatea testului = 30.

Observații

Testul cu ZnSO_4 este superior testului cu CuSO_4 , deoarece CuSO_4 nu poate fi tamponat și atunci stabilitatea pH-ului nu mai este asigurată. Atât reacția cu ZnSO_4 cât și cea cu CuSO_4 este influențată de modificările pH-ului.

Interpretare

Acest test este pozitiv în afecțiunile difuze hepatice, în special în hepatită. În ciroze, o dată cu agravarea se constată și intensificarea pozitivității. Există un paralelism perfect între intensitatea reacției și evoluția procesului hepatic.

TESTUL WUNDERLY - WUHRMANPrincipiu

Sulfatul de cadmiu produce o floculare a serului cînd serinele scad sub 20 g %, ca urmare a unei hiperglobulinemii alfa și gama sau datorită apariției unei paraglobuline situate între alfa și gama.

Reactivi

1. Sol. $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 4 g %

Modul de lucru

Se iau 0,4 ml ser și apoi se lasă să cadă cu picătura, agitînd continuu, din soluția de CdSO_4 , pînă în momentul apariției unei tulburări nete.

Calcul

Turbiditatea se exprimă prin numărul de picături din soluția de CdSO_4 .

Valori normale

Turbiditatea testului = 5 - 7 picături

Observații

Testul poate fi făcut și în felul următor:

ser 0,4 ml

CdSO_4 0,2 ml

Se agită, se lasă în repaus timp de 5 minute. Dacă apare o turbiditate după acest interval de timp, testul este pozitiv; dacă nu, se adaugă o picătură de reactiv, se agită și se așteaptă încă 5 minute. Interpretarea se face astfel:

reacție negativă = amestec clar

reacție + = s-a adăugat încă o picătură de reactiv

reacție ++ = turbiditatea după 5 minute

reacție +++ = precipitare imediată

Creșterea globulinelor negativează reacția.

Interpretare

Reacția este normală în majoritatea bolilor fără leziune hepatică și este pozitivă în cirozele avansate. În hepatită, reacția este pozitivă și intensitatea ei variază cu starea generală a bolnavilor. De asemenea este pozitivă și în glomerulonefrite și scleroze renale.

TESTUL MC LAGAN

Principiu

La pH 7,55 timolul flocoalează globulinele din ser, când acestea sînt crescute peste o anumită concentrație, formînd un complex globulină-timol-colesterol-fosfolipide.

Reactivi

1. Sol. timol tampon pH= 7,6-7,8

acid dietil-barbituric(veronal)	1,38 g
----------------------------------	--------

dietil-barbiturat de sodiu	
----------------------------	--

(veronal sodic sau medinal)	1,03 g
------------------------------	--------

timol	3,00 g
-------	--------

apă distilată pînă la	500 ml
-----------------------	--------

Totul se pune la fiert, pînă la solvirea

completă a timolului .In caz de evaporare, comple-
tează din nou pînă la 500 ml.Se răcește apoi la cu-
rent de apă, pînă la turbureală.Se pulverizează cîți-
va cristali și se aduc în balon.Se agită,se lasă la
rece pentru 12 ore.Se poate utiliza după aceasta, dar
se filtrează înaintea fiecărei utilizări.

2. Sol. clorură de bariu 1,15 g %

3.Sol. acid sulfuric N/5

4. Scara etalon:

Pentru aceasta se amestecă 3 ml din soluția de
clorură de bariu cu 97 ml din soluția de acid sulfu-
ric.Opacifierea acestei soluții corespunde la 20 uni-
tăți Mc Lagan.

Se fac apoi diluțiile conform tabelului:

Nr. eprubete	1	2	3	4	5	6		10
U.Mc Lagan	20	18	16	14	12	10		2
Sol. BaSO ₄	10	9	8	7	6	5		1
Sol. H ₂ SO ₄ N/5	-	1	2	3	4	5		9

Eprubeta se astupă cu dop și se parafi-
nează.Inainte de utilizare se agită.

Modul de lucru

Se iau într-o eprubetă 3 ml de timol și
se adaugă 0,05 ml ser. Se amestecă, se lasă în repa-
us 30' . Se agită din nou și se compară cu care epru-
betă din scară este identitate de turbiditate,se ci-
tesc unitățile Mc Lagan corespunzătoare.

Calcul

Turbiditatea testului este dată în unități Mc Lagan.

Valori normale

Turbiditatea testului = 4 U Mc Lagan

Observații

Se poate examina extincția față de soluția timol la 470 nm, utilizând cuvele de 5 mm. Se citește absorbția însemnată cu cifre negre pe tambur și se scade din 100. Normal 10-20 diviziuni

Testul poate fi negativat datorită albuminei sau dacă se face din plasmă oxalatată.

Bilirubina, lipemia crescută, unele antibiotice pozitivează reacția.

Interpretare

Testul este pozitiv peste 6 U în afecțiunile hepatice difuze, hepatite sau în ciroză.

TESTUL WELTMANN CU CaCl_2

(banda de coagulare)

Principiu

Prin încălzirea în prezența electroliților (CaCl_2) a serului diluat cu apă, are loc coagularea globulinelor.

Reactivi

1. Sol. CaCl_2 0,5 g %

Modul de lucru

In eprubete numerotate de la 1 - 12 se măsoară:

Nr.eprubete	1	2	3	4	5 . . .	12
CaCl ₂ ml	5	4,5	4	3,5	3	0,5
Apă "	-	0,5	1	1,5	2	4,5
Ser	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

După adăugarea tuturor reactivilor se agită puternic și se fierb eprubetele la baie de apă timp de 15 minute. Se răcesc și se examinează rezultatele.

Rezultate

Creșterea α -globulinelor produce scurta-rea benzii sau devierea la stînga, deci creșterea pragului de coagulare.

Alungirea benzii, deci existența coagulării în eprubete superioare eprubetei 7, indică scăderea pragului de coagulare și o creștere a γ -globulinelor.

Valori normale

Coagulare în eprubetele 1 - 7

Observații

Cantitatea necesară de electrolit variază cu starea normală sau patologică a serului.

Interpretare

Creșterea pragului de coagulare are loc în procese acute inflamatorii necrotice, exudative, sindrom nefrotic.

Alungirea benzii are loc în procese inflamatoare cronice și fibroase, cirotice.

TESTUL GATE

Principiu

Formolul blochează radicalii aminați ai catenei peptidice modificând ionizarea globală a proteinelor. Are loc o creștere a vîscozității pînă la gelificare în cazul serurilor patologice.

Reactivi

1. Sol. formol 40 % neutralizat cu carbonat de sodiu sau hidroxid de sodiu.

Modul de lucru

Se ia într-o eprubetă 1 ml de ser peste care se adaugă 2 picături din soluția de formol. Se observă prinderea în masă la 10 minute, la 2 ore și la 24 ore.

Rezultate

Reacție intens pozitivă - gelificare după 10 minute.

Reacție pozitivă - gelificare după 2 ore.

Reacție negativă - gelificare după 24 ore.

Se produce gelificare în cazul creșterii γ -globulinelor.

Valori normale

Normal se produce gelificare după 24 ore.

Observații

Fibrinogenul pozitivă reacția.

Interpretare

Reacția este pozitivă în următoarele cazuri: boli tropicale, tuberculoză, lepră, leucemii limfatice, endocardită lentă, mieloame.

În colicistite reacția este negativă.

Cirozele și icterele dau reacții neconcludente.

DOZAREA BILIRUBINEI

(Metoda Jendrassik)

Principiu

Bilirubina liberă formează cu acidul sulfanilic un colorant azoic, care este roșu în mediu neutru. Prezența cafeinei este necesară pentru a elibera bilirubina conjugată.

Reactivi

1. Sol. cafeină:

cafeină	20 g
benzoat de Na	30 g
acetat de Na	50 g
apă dist.	400 ml

Se agită și se încălzește ușor pînă la solvirea completă.

2. Sol. NaCl 9 g %

3. Reactiv diazo:

sol.A -acid sulfanilic 0,5 g
 HCl conc, 1,5 ml
 Apă dist.pînă la 100 ml
 sol.B- azotit de Na 0,5 g
 apă dist. la 100 ml

In momentul întrebuintării se amestecă
 10 ml soluție A cu 0,3 ml soluție B.

Modul de lucru

In următoarele eprubete se pipetează:

	Bilirubina		
	totală ml	directă ml	Martor ml
Cafeină	3,5	-	-
Reactiv diazo	0,5	0,5	-
NaCl	-	3,5	4
Ser	1	1	1

Se agită, se lasă în repaus 5 minute la întuneric, după care se citește extincția celor două probe față de martor la 530 nm.

Calcul

$E \times 6,34 = \text{mg bilirubină directă sau totală la } \%$

Bilirubină totală - bilirubină directă = mg
 bilirubină indirectă %

Valori normale

Ser = 4 - 10 mg bilirubină totală %

Observații

La reacția pentru dozarea bilirubinei totale se poate adăuga soluție Fehling II atît la

probă cât și la martor; se formează o bilirubină azo-ică albastră a cărei extincție se măsoară la 578 nm, eliminând astfel produșii secundari care interferează.

In acest caz dozarea bilirubinei totale se efectuează în modul următor:

	Bilirubina totală	Martor
	ml	ml
acid sulfanilic	0,2	0,2
azotit de Na	0,1	-
cafeină	1	1
Ser	0,2	0,2

Se agită și se lasă la temperatura camerei timp de 10 minute

Sol. Fehling II	1	1
-----------------	---	---

Se agită, se lasă în repaus timp de 5 minute, după care se citește extincția la 578 nm.

Calcul

$E \times 105 = \text{mg bilirubină totală } \%$

Interpretare

Cantitatea de bilirubină din ser crește în icterele de diverse patogenii. In icterele hemolitice creșterea este moderată,

CERCETAREA PORFIRINELOR URINARE

Principiu

Porfirinele extrase din lichidele biologice prezintă benzi de absorbție caracteristice între 396 - 410 nm.

Reactivi

1. Eter
2. Sol. acid clorhidric 10 %
3. Acid acetic glacial
4. Acetat de etil

Modul de lucru

Intr-o pîlnie de separare se introduc 10 ml urină proaspătă, 2 ml acid acetic glacial, 20 ml eter, se agită puternic pentru ca porfirinele eterosolubile(coproporfirinele) să treacă în faza eterică, iar uroporfirinele să rămînă în faza apoasă. Se decantează faza eterică într-o eprubetă lipsită de fluorescență, se adaugă 5 ml HCl 10 %, se agită puternic. Coproporfirinele trec în soluția acidă unde pot fi puse în evidență prin fluorescența roșie în lumina ultravioletă.

Soluția apoasă de la extracția cu eter care conține uroporfirinele se tratează cu un volum egal de amestec acid acetic glacial : acetat de etil (1:3). Uroporfirinele trec în stratul de acetat de etil care se decantează într-o eprubetă lipsită de fluorescență și se tratează cu 5 ml HCl 10 %. Uroporfirinele trec din acetatul de etil în soluția

acidă și pot fi puse în evidență prin fluorescența dată în lumina ultravioletă.

Rezultat

In mod normal proba este negativă.

Probele pozitive sînt todeauna patologice.

Observații

Soluțiile clorhidrice care conțin coproporfirine și uroporfirine au o fluorescență roșie a cărei intensitate variază în raport cu concentrația porfirinelor, de la carmin deschis la roșu-roz și roșu-cărămiziu.

Dacă extractul este incolor, examinarea se face la lampa cu vaporii de mercur prin intermediul unui filtru (sticlă neagră) care oprește spectrul vizibil și lasă să treacă razele ultraviolete.

Prezența sîngelui în urină poate da erori importante în cercetarea porfirinelor deoarece prin hidroliză acidă, din sînge sînt eliberate protoporfirinele care prezintă o fluorescență roșie intensă. Chiar o hematurie slabă poate fi confundată cu o uroporfirimurie intensă. În aceste cazuri se cercetează prezența sîngelui în urină cu reacțiile Kastle-Meyer și benzidină, sau se verifică absorbția optică la 405 nm, lungime de undă la care uroporfirina prezintă un maxim de absorbție, în timp ce protoporfirina nu prezintă acest fenomen.

DOZAREA PORFIRINELOR URINARE

Principiu

Același ca și la cercetarea porfirinelor urinare.

Reactivi

1. Sol. saturată de acetat de sodiu
2. Acid acetic glacial
3. Eter
4. Acetat de sodiu 3 %
5. Sol. acid clorhidric 3 N
6. Sol. acid clorhidric 1,5 N

Modul de lucru

a) Separarea coproporfirinelor de uroporfirine.

Intr-o pîlnie de separare se introduc 50 ml urină proaspătă, 10 ml soluție saturată de acetat de sodiu, 15 ml acid acetic glacial și 75 ml eter. Se agită fără să se emulsioneze și se lasă în repaus o oră. Se separă faza eterică de faza apoasă.

Faza apoasă se introduce din nou în pîlnie și se face o nouă extracție cu încă 75 ml eter.

Extractele eterice se reunesc și se spală prin agitare de două ori cu cîte 2 ml acetat de sodiu 3%. Această operație se face pentru a putea îndepărta urmele de uroporfirină, eventual antrenate în faza eterică. Acetatul de sodiu de la spălare se trece peste fazele apoase de la extracțiile în care se dozează uroporfirinele.

b) Dozarea coproporfirinelor

Extractele eterice care conțin coproporfirinele sînt tratate cu cîte 2 ml HCl 3 N pînă la epuizarea colorației roz a soluției eterice. Se aduce soluția clorhidrică la pH 3,2 cu soluție saturată de acetat de sodiu și se trece într-o pîlnie de separare. Se adaugă 1 ml acid acetic glacial și o cantitate de eter egală cu de două ori volumul lichidului. Se agită și se separă faza eterică de cea apoasă. Faza eterică se spală cu 2 ml acetat de sodiu 3 % pentru a îndepărta urmele de uroporfirină.

Faza eterică este tratată cu 2 ml HCl 1,5 N pînă la epuizarea fluorescenței notîndu-se volumul soluției obținut, ținînd seama că s-a pornit extracția din 50 ml urină.

Citirea extincțiilor se face la 430, 405, 402, 401 și 380 nm. Maximum de extincție se observă la 401 - 402 nm.

Calcul

$$E_{402} \times 1,5 \times \text{vol. soluției clorhidrice} \times \frac{1000}{50} =$$

μg coproporfirină la 1000 ml urină.

Valori normale

Pînă la 150 μg în 24 ore.

c) Dozarea uroporfirinelor

Faza apoasă de la extracțiile cu eter este tratată cu un volum egal de amestec acid acetic-glacial - acetat de etil (1:3). Uroporfirinele trec în amestecul acid acetic - acetat de etil. Amestecul



este apoi tratat cu câte 2 ml HCl 3 N pînă la epuizarea fluorescenței. Se aduce soluția clorhidrică la pH 3,2 cu soluție saturată de acetat de sodiu și se trece într-o pîlnie de separare unde se tratează cu 20 ml amestec acetat de etil - acid acetic. Uroporfirinele extrase în amestec sînt tratate cu câte 2 ml HCl 3 N pînă la epuizarea fluorescenței, notîndu-se volumul final al soluției clorhidrice și ținînd seama de volumul urinei de la care s-a pornit extracția. Se citesc extincțiile la 430, 405, 402, 401 și 380 nm. Maximum de extincție se observă la 405 nm.

Calcul

$$E_{405} \times 1,534 \times \text{vol. sol. clorhidrice} \times \frac{1000}{50} =$$

μg uroporfirină la 1000 ml urină.

Valori normale

2 - 15 μg în 24 ore.

Observații

Citirile se fac la maximum 2 ore de la terminarea reacțiilor.

Urina se recoltează în vase de culoare închisă în care se află cîtiva ml dintr-o soluție de oxicianură de mercur 1 %, un cristal de timol sau 1 ml toluen.

Cînd cantitatea de porfirine este mare urina prezintă o tentă roz-roșie sau o fluorescență roșie în lumina ultravioletă.

Interpretare

Prin porfirinopatii se înțelege acel

tabloul clinic și biologic determinat de tulburări ale metabolismului porfirinelor provocate de:

- scăderea cantității de fier necesar sintezei de protoporfirină

- inhibarea inserării fierului pe nucleul de protoporfirină

- tulburări ale sintezei de protoporfirină de natură alimentară sau enzimatică.

Porfirinopatia simptomatică apare în hepatopatii, boli de sînge, boli infecțioase, avitaminoză și intoxicații cu plumb. În acest caz se întâlnește creșterea excreției urinare de coproporfirine, de unde și denumirea de coproporfirinurie simptomatică și absența excreției de uroporfirină și porfobilinogen.

Porfiriea poate fi de natură eritropoetică (congenitală) care se traduce prin excreția crescută de uroporfirină și coproporfirine și absența excreției de porfobilinogen, sau de natură hepatică, caracterizată prin excreție crescută de porfobilinogen, uroporfirină și coproporfirină.

ELECTROLITI

DOZAREA NaCl IN SINGE (Metoda Volhard - Charpantier)

Principiu

După distrugerea substanțelor organice din ser prin fierbere cu permanganat de K în mediu de acid azotic, clorul din sînge este precipitat cu azotatul de argint. Excesul de AgNO_3 se titrează cu sulfocianură de amoniu în prezența alaunului feri-amoniacal, care indică sfîrșitul reacției prin apariția unei colorații roz.

Reactivi

1. Sol. AgNO_3 2,9063 g %
2. Sol. saturată de permanganat de K
3. HNO_3 concentrat
4. Alaun feri-amoniacal 5 g %
5. Glucoză cristale sau apă oxigenată
6. Sol. sulfocianură de amoniu 1,3011 g %

Modul de lucru

Intr-un balon Erlenmeyer ce conține cîtiva ml apă distilată se introduce cu micropipeta 0,1 ml ser, plasmă sau globule. Se adaugă 1 ml soluție AgNO_3 , 0,5 ml soluție saturată de permanganat de K și 1 ml HNO_3 . Se fierbe 10 minute, timp în care are loc oxidarea materiilor organice. Totodată are loc și preci-

pitarea clorului sub formă de clorură de argint.

Pentru a putea titra excesul de AgNO_3 se decolorează permanganatul prin adăugarea a 1-2 picături de apă oxigenată sau a unei mici cantități de glucoză. Se răcește, se adaugă 10 picături soluție alaun feri-amoniacal și se titrează până la viraj roz cu sulfocianura de amoniu.

Calcul

$1 \text{ ml } \text{AgNO}_3 = 1 \text{ ml } \text{NH}_4\text{SCN} = 0,001 \text{ g NaCl}$

$(1 - N) \times 0,001 \times 1000 = \text{g NaCl } \text{‰ ml}$

Pentru a exprima în clor se înmulțește cantitatea de NaCl găsită cu 0,6068.

Valori normale

Plasmă: 3,6 g Cl ‰ sau 5,8 g NaCl ‰

Hematii: 1,9 - 2,2 g Cl ‰

Raportul clor globular/clor plasmatic =
0,48 - 0,52.

DOZAREA CLOPURILOR IN SER

(Metoda O.Schales și S.Schales)

Principiu

Ioni de clor formează cu ioni de mercur clorura de mercur nedisociabilă. Când toți ioni de clor au fost fixați, excesul de ioni de clor formează cu f

Reactivi

1. Sol. nitrat mercuric 0,01 N
1 ml = 0,355 mg Cl
2. Sol. acid sulfuric 2/3 N
3. Sol. alcoolică de difenilcarbazonă 0,250 %
4. Sol. etalon de acid clorhidric 0,1 N

Modul de lucru

In următoarele baloane Erlenmeyer de 25ml capacitate se pipetează:

	Proba		Etalon
	1	2	
	ml	ml	ml
Apă bidistilată	1	1	1
Ser, LCR	0,1	0,1	-
Sol. etalon	-	-	0,1
Sol. H_2SO_4	0,1	0,1	0,1
Indicator	0,2	0,2	0,2

Se agită și se titrează cu soluție de nitrat mercuric pînă la virajul spre violet.

Calcul

ml soluție nitrat mercuric utilizați $\times 3,55 =$
g Cl ‰

Valori normale

	Cl g ‰	NaCl g ‰
Ser:	3,34 - 3,76	5,8
LCR:	4,25 - 4,61	7,0 - 7,6
Urină:	6 - 9	10 - 14

Observații

Soluția etalon este necesară pentru a verifica soluția de n'trat mercuric și pentru a pune în evidență sfârșitul titrării.

Desalbuminarea serului este inutilă.

Pentru dozarea în urină se face o diluție de 1:1, rezultatul înmulțindu-se cu 2.

Reacția are loc la pH 3, de aceea este necesară ajustarea pH-ului urinar cu H_2SO_4 2/3 N sau HNO_3 N.

Dacă serul este hemolizat sau icteric se face o defecare în modul următor:

apă distilată	4 ml
ser	0,5 ml
H_2SO_4 2/3 N	0,25 ml
tungstat de Na 10 %	0,25 ml

Se agită și se centrifughează. Un ml supernatant este egal cu 0,1 ml ser.

Bromurile reacționează identic cu clorurile, modificând rezultatele.

Virajul spre violet de la începutul titrării nu trebuie luat în considerație.

DOZAREA NaCl IN URINA

(Metoda Mohr)

Principiu

Clorul din urină este precipitat cu $AgNO_3$ sub formă de clorură de argint insolubilă, cromatul

de potasiu servind drept indicator al reacției.

Cînd întreaga cantitate de clor a fost consumată, prima picătură în exces de AgNO_3 formează cu cromatul de K, cromatul de argint. Culoarea virează de la galben-citrin la roșu-cărămiziu.

Reactivi

1. Sol. de cromat de potasiu 10 %
2. Sol. titrată de AgNO_3 2,9063 g %

Modul de lucru

Intr-un balon Erlenmeyer de 25 ml se pipetează 2 ml apă distilată, 0,1 ml urină și 2-3 picături de cromat de K. Se titrează cu AgNO_3 pînă la apariția culorii roșu-cărămiziu.

Este indicat ca înainte de terminarea titrării să se adauge o picătură de cromat de argint pentru ca virajul să fie mai sensibil.

Din numărul de ml de AgNO_3 utilizați se scade 0,03 ml corespunzător unei picături în exces care formează cromatul de argint.

Pentru a avea o dozare precisă se lucrează cu un martor care conține AgNO_3 , cromat de K și NaCl în exces - pentru compararea culorii -

Calcul

$$1 \text{ ml sol. } \text{AgNO}_3 = 0,001 \text{ g NaCl}$$

$$N \times 0,001 \times 10000 = N \times 10 = \text{g NaCl } \%$$

Valori normale

$$10 - 12 \text{ g } \% \text{ sau } 120 - 200 \text{ mEq /l}$$

Observații

Deoarece cromatul de argint este solubil în acizi, soluția de analizat trebuie să fie neutră. Neutralitatea se realizează prin adăugare de carbonat de calciu.

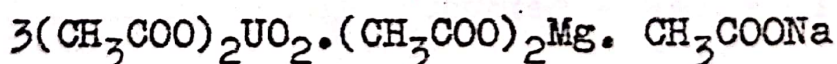
Metoda este exactă pentru soluții concentrate. Dacă soluțiile sînt prea diluate, acestea sînt concentrate în prealabil prin fierbere.

Titrarea se face totdeauna la rece, deoarece cromatul de argint este solubil la cald.

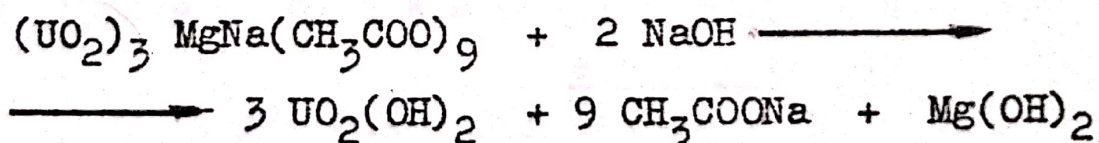
Metoda prezintă avantaje, deoarece nitrații, sulfatii, bicarbonații și borații nu influențează reacția. Se poate utiliza această metodă și la dozarea clorului în ser sau ICR, dar rezultatele sînt valabile numai pentru limitele normale.

DOZAREA SODIULUI IN SERPrincipiu

Sodiul din ser se precipită cu reactiv magneziu uranilic sub formă de acetat triplu de sodiu, magneziu și uranil:



Precipitatul se poate cîntări sau se reia cu apă și se titrează cu NaOH.



Reactivi

1. Sol. acetat de magneziu și uranil

acetat de uranil	32 g
acetat de magneziu	100 g
acid acetic glacial	20 ml
alcool 96°	500 ml
apă distilată	300 ml

Se încălzește pe baia de apă, pînă la completa solvire și apoi, după răcire se completează la 1000 ml cu apă distilată. Se lasă în repaus 2-3 zile la întuneric și apoi se filtrează.

2. Sol, acid tricloracetic 20 g %

3. Sol. amoniac 10 %

4. Alcool saturat cu precipitat de sare de acetat triplu de uranil, magneziu și sodiu. La 1 litru de alcool 96° se adaugă precipitatul de sare triplă de la cîteva dozări gravimetrice anterioare. Se filtrează.

5. Sol, NaOH N/10

6. Sol. indicator fenolftaleină

Modul de lucru

Se iau într-o eprubetă 2 ml ser, 6 ml apă distilată și 2 ml soluție acid tricloracetic, se agită, se filtrează. Din filtrat se iau 2,5 ml (corespunzători la 0,5 ml ser), se adaugă o picătură fenolftaleină și se neutralizează pînă la viraj roz, cu soluție de amoniac.

Se adugă apoi 10 ml acetat de magneziu și uranil, se agită și cu o baghetă de sticlă se freacă

pereții interiori ai eprubetei pentru a grăbi precipitarea. Se spală bagheta cu 2-3 picături de alcool saturat. Se lasă în repaus 1 oră sau mai bine 24 ore, după care se centrifughează. Se decantează lichidul clar prin răsturnarea eprubetei. Se adaugă peste precipitat 5 - 10 ml alcool saturat, se agită, se centrifughează și se decantează. Se repetă operația de spălare de 2-3 ori.

Precipitatul se reia cu 20 ml apă distilată într-un pahar Berzelius. Se adaugă o picătură soluție de fenolftaleină și se titrează cu NaOH până la viraj roz-pal.

Calcul

$$N \times 0,0002875 \times 2000 = \text{g Na \% ml ser}$$

0,0002875 provine:

1 ml NaOH N/10 conține 0,004 g NaOH. Din reacție rezultă că la o moleculă de sare triplă (23 g Na) corespund 8 molecule de NaOH (8 x 40 g NaOH), adică:

23 g Na		8 x 40 g NaOH
X		0,004 g NaOH

$$X = \frac{23 \times 0,004}{8 \times 40} = \frac{0,0023}{8} = 0,0002875$$

Valori normale

Ser: 3,24 g Na \% ml sau 140 mEq/l

Urina: 4 - 8 g \% ml sau 120 - 200 mEq/l

Observații

Dozarea sodiului în urină se efectuează la fel ca și în sânge.

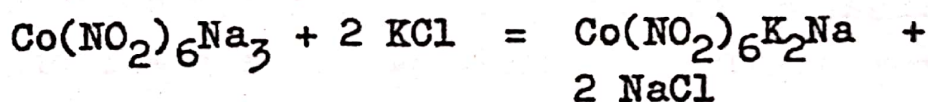
Pentru scurtarea timpului analizei se poate trece precipitatul și supernatantul într-un filtru Guch (G_4) pus la o trompă de vid. Se spală apoi de 4 ori cu câte 3 ml alcool saturat cu sare triplă. După spălare, precipitatul este reluat cu 20 ml apă și titrat ca mai sus.

DOZAREA POTASIULUI IN SINGE

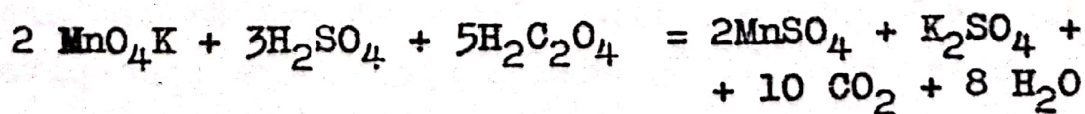
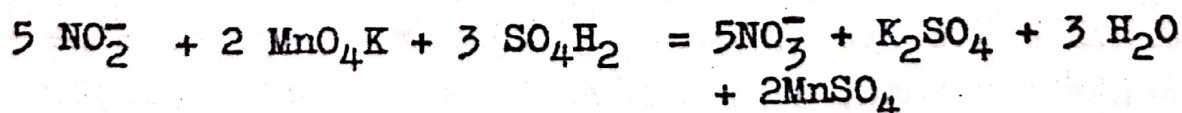
(Metoda Kramer Tisdall)

Principiu

Potasiul din ser este precipitat cu cobaltnitrit de Na sub formă de cobaltnitrit de Na și K



Prin adăugarea în exces de permanganat de potasiu, grupa nitrit a complexului este oxidată la grupa nitrat. Surplusul de permanganat este apoi titrat cu acid oxalic:



Reactivi

1. Reactiv nitrocobaltic:

Sol. A: nitrit de sodiu	120 g
apă distilată	180 ml
Sol.B: nitrat de cobalt	25 g
apă distilată	50 ml
acid acetic glacial	12,5 ml

La soluția B se adaugă 210 ml din soluția A. Se trece apoi un curent de aer prin soluție pentru a îndepărta vaporii nitroși. Înaintea fiecărei titrări se va trece un curent de aer prin soluție.

2. Sol, permanganat de potasiu N/100

3. Sol, H_2SO_4 10 %

4. Sol. acid oxalic N/100

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de centrifugă se ia 1 ml de ser nehemolizat și 2 ml reactiv nitrocobaltic care se adaugă picătură cu picătură prin agitare continuă. Se freacă apoi pereții eprubetei cu ajutorul unei baghete de sticlă pentru a grăbi precipitarea. Se lasă în repaus 45 minute.

Se spală bagheta cu 2 ml apă distilată și se centrifughează puternic timp de 20 minute. Se decantează.

Se spală apoi precipitatul cu 20 ml apă distilată desprinzându-l cu ajutorul baghetei. Se centrifughează, se decantează. Se repetă această spălare de 3 ori (mai bine pînă cînd apa de spălare este perfect clară). Se adaugă apoi peste precipitat

4 ml din soluția de permanganat și 1 ml de H_2SO_4 . Se încălzește 1/2 minut la baia de apă. Amestecul trebuie să rămână colorat ca dovadă că nu a fost utilizată pentru oxidarea grupării nitrit a complexului întreaga cantitate de permanganat și deci a rămas o cantitate în exces care se va titra. Dacă însă se decolorează permanganatul imediat, se mai adaugă 1 ml din soluția de permanganat. Se amestecă cu o baghetă și se pune la baia de apă timp de 1 minut și 1/2.

După aceasta se adaugă exact 2 ml din soluția de acid oxalic. Permanganatul care nu a intrat în reacție cu gruparea nitrit a complexului cobaltic este descompus în mod cantitativ de către acidul oxalic. Surplusul de acid oxalic se titrează acum cu permanganat.

Calcul

$$1 \text{ ml } KMnO_4 \text{ N/100} = 0,071 \text{ mg K}$$

N = numărul de ml $KMnO_4$ utilizați în total la titrare.

$N - 2$ ml acid oxalic = numărul de ml $KMnO_4$ consumați de cobaltnitritul de Na și K.

$$(N - 2) \times 0,071 = \text{g K } \% \text{ ml ser.}$$

Valori normale

Plasmă: 0,16 - 0,22 g % sau 4 - 5,5 mEq/l

Globule: 34 - 59,5 g % sau 134 - 248 mEq/l

Urină: 1 - 4 g % sau 40 - 50 mEq/l

Observații

Serul în care se dozează potasiul trebuie să fie nehemolizat și proaspăt separat de chiag,

deoarece concentrația de K în globule este de aproximativ 10 ori mai mare și difuzează prin membrana eritrocitară.

Pentru dozarea K în globule, sângele se recoltează cu un anticoagulant fără K, se centrifughează imediat și se separă de plasmă. Se face apoi hemoliza: 0,2 ml globule la care se adaugă 1,8 ml apă distilată, se agită. Se adaugă 2 ml acid tricloracetic 20 %, se agită, se lasă în repaus 5 minute, după care se centrifughează sau se filtrează. Din filtrat se utilizează pentru dozare 2 ml ceea ce corespunde la 0,1 ml globule.

Pentru dozarea K în urină se îndepărtează amoniacul astfel:

Intr-un balon Erlenmeyer se introduc

urină 5 ml

Sol. NaNO_3 20 % 5 ml

Sol. ac. acetic 10% 5 ml

Se amestecă și se ține la baia de apă care fierbe, timp de 30 minute agitând din când în când. După răcire se transvazează într-un balon cotat de 50 ml și se completează la semn cu apă distilată. Din această soluție se utilizează pentru dozarea K 5 ml, ceea ce corespunde la 0,5 ml urină.

Interpretare

Variațiile natremiei sînt în general însoțite de modificări ale volumelor hidrice. Modificarea natremiei influențează presiunea osmotică a plasmei, determinînd modificări adaptative ale secreției de aldosteron și ADH și a repartiției lichidelor în spațiul celular și extracelular.

Hiponatremia (scăderea Na^+ seric sub 130 mEq/l) poate fi:

- hiponatremie absolută - datorită lipsei de sare din cauza unui aport insuficient, dar de cele mai multe ori din cauza unor pierderi exagerate de lichide electrolitice în care pierderea de Na^+ est comparativ mai mare decît cea de apă. Aceste pierderi sînt întîlnite în vărsături, diaree, transpirații abundente, arsuri, insuficiență corticosuprarenală, hipoaldosteronism primar.

Uneori scăderea natremiei se datorește reținerii unor lichide bogate în Na^+ (lichidul de edem al arsurilor, lichidele digestive în ocluzia intestinală, lichidele pleurale și peritoneale. In aceste cazuri, scăderea Na^+ în lichidele extracelulare are ca rezultat migrarea apei în celulă.

Caracteristic este scăderea pînă la dispariție a excreției urinare de Na^+ , cu excepția deshidratărilor prin nefropatii sau ca urmare a diminuării descărcărilor de aldosteron.

- hiponatremie diluțională - se produce prin retenție de apă - hiperhidratarea globală -

întâlnită în insuficiența cardiacă sau hipersecreția de ADH (afecțiuni pulmonare, cerebrale, etc.)

- hipernatremie esențială - care nu este însoțită de tulburări ale echilibrului hidric iar eliminările urinare sînt normale. Hiponatremia esențială a fost observată la denutriți, cașectici, cardiaci, cirotici în stare avansată, precum și la cei alimentați parenteral la care nu se administrează și potasiu.

Hipernatremia (creșterea Na^+ peste 150 mEq/l) se întîlnește mai rar ca rezultat al unui aport exagerat de Na^+ sau al suprimării aportului hidric, cel mai frecvent fiind consecință a tulburărilor de eliminare a Na^+ .

Astfel de tulburări sînt prezente la bolnavii neuropsihici la care este alterată senzația de sete, bolnavi alimentați pe sondă cu lichide care conțin cantități mari de substanțe solvite.

Eliminarea în exces a apei față de eliminarea Na^+ este cauza obișnuită a hipernatremiilor relative și se datorește pierderilor renale (diabet insipid, diabet zaharat), pierderilor cutanate (transpirații, arsuri), pierderilor pulmonare exclusiv hidrice (hiperventilația din stările febrile, leziuni cerebrale, etc.)

Există și hipernatremie pură, fără modificări ale volumelor hidrice, foarte rar întîlnită, în stadii evolutive precoce ale unor hipertensiuni.

Excreția de Na^+ de către rinichi este

influențată de schimbarea ritmului de filtrare glomerulară, de concentrația serică a sodiului, de activitatea corticosuprarenalei, de volumul lichidului extracelular.

Eliminarea sodiului este substanțial modificată de aportul exogen.

Eliminarea crescută de sodiu urinar este întâlnită mai ales în insuficiența suprarenală, nefropatii interstițiale sau tubulare și abuzul de diuretice.

Tulburările metabolismului clorului, însoțesc tulburările metabolismului sodiului și a apei cu excepția acidozei hiperclorémice și ale alcalozei hipoclorémice.

Hipoclorémii întâlnim în vărsături, când se pierde mai mult clor decât sodiu, pe care organismul tinde să-l economisească. Când vărsăturile persistă hipoclorémia se va asocia cu un deficit potasic.

În diaree odată cu clorul se pierde și mari cantități de sodiu știind că secreția pancreatică aduce mari cantități de sodiu. În consecință vom avea o hipoclorémie cu hiponatremie.

Ocluziile intestinale, în urma fixării unei mari cantități de clorură de sodiu pe produsele toxice, ascitele punționale, pierderile sudorale masive sau folosirea diureticilor mercuriale duc la apariția stărilor de hipoclorémie.

Hiperclorémii pot apărea în intoxicația

cu clorură de amoniu ca urmare a unui tratament cu acidifiante sau, în urma utilizării rășinilor schimbătoare de ioni.

Modificările concentrației serice a potasiului nu indică în mod constant schimbările paralele și echivalente ale potasiului total, simptomele clinice fiind legate de perturbarea raportului dintre potasiu intracelular și cel extracelular.

Starea de hipopotasemie serică indică o scădere a potasiului celular, mai ales când concentrația sa scade sub $3,5 \text{ mEq} / \text{l}$ și ea se poate întâlni în:

Aport insuficient de potasiu, ca urmare a unei carențe nutritive prelungite, pierderea renală fiind continuă.

Eliminarea de potasiu la nivelul tractului gastro intestinal prin vărsături, diaree prelungite, fistule intestinale. Datorită deshidratării organismului, avem un exces de sodiu care pătrunde în celule și mobilizează potasiul, care continuă să se elimine accentuând progresiv sindromul de carență potasică.

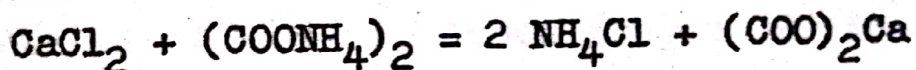
Hiperpotasemii pot fi întâlnite în procesele hemolitice, datorită distrugerilor de globule roșii care pun în libertate o mare cantitate de potasiu.

În unele afecțiuni renale însoțite de oligurii, când potasiu nu se filtrează glomerular, în boala Addison în traumatismele grave sau în insuficiența hepatică putem avea o hiperpotasemie.

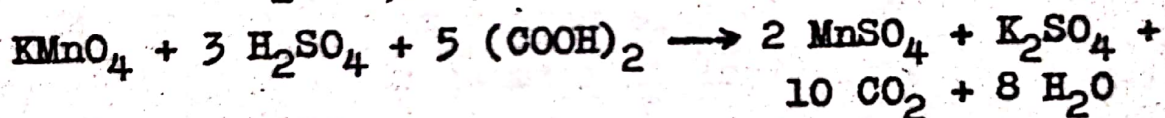
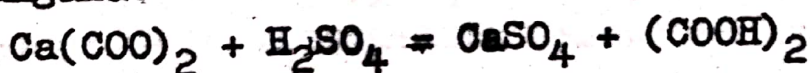
DOZAREA CALCIULUI IN SER

Principiu

Calciu din ser este precipitat cu oxalat de amoniu sub formă de oxalat de calciu.



Oxalatul de calciu tratat cu acid sulfuric eliberează acidul oxalic, care este titrat cu permanganat



Reactivi

1. Sol. saturată de oxalat de amoniu
2. Sol. amoniac 2 %
3. Sol. acid sulfuric 10 %
4. Sol. permanganat de potasiu N/100

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de centrifugă cu vârful conic se introduce 1 ml apă bidistilată, 1 ml ser și 1 ml oxalat de amoniu. Se agită și cu o baghetă se freacă ușor pereții eprubetei timp de 3 minute. Fără a scoate bagheta, eprubeta se lasă în repaus cel puțin 30 minute (mai bine de 24 ore). În acest timp calciu este precipitat sub formă de oxalat de calciu. Se desprinde precipitatul de pe pereții eprubetei cu ajutorul baghetei și se spală bagheta cu 6 ml apă bidisti-

lată. Se centrifughează și se decantează lichidul clar cu precauție pentru a nu antrena și precipitatul.

Pentru îndepărtarea urmelor de oxalat de amoniu se spală precipitatul cu 2 ml soluție amoniac. Se amestecă cu aceeași baghetă care se spală apoi cu câteva picături de amoniac ce se aduc de asemenea în eprubetă. Se centrifughează la turație mare și se decantează. Se repetă operația de 3 ori sau mai bine pînă cînd supernatantul nu mai conține oxalat. Pentru aceasta, peste supernatantul de la a 3-a centrifugare se adaugă 1 ml soluție de H_2SO_4 , se încălzește la baie de apă și se adaugă permanganat de potasiu.

Dacă în supernatant mai există oxalat, primele două picături de permanganat vor fi decolorate. În acest caz se va continua spălarea pînă cînd picăturile de permanganat nu vor fi decolorate. Peste precipitatul de oxalat de calciu se adaugă 2 ml din soluția de H_2SO_4 , se încălzește eprubeta la baie de apă și apoi se titrează cu permanganat de potasiu pînă la culoarea roz-pal care persistă 2 minute.

Calcul

Echivalentul gram al Ca. = $40,09/2 = 20,045$. La 1 ml soluție $KMnO_4$ N/100 corespund 0,2 mg Ca.

$$N \times 0,2 \times 1000 = N \times 200 \text{ mg Ca } \% \text{ ml ser}$$

Valori normale

90 - 110 mg Ca % ml ser sau

4 - 5,75 mEq/l ser

Observatii

Indepărtarea urmelor de oxalat de amoniu este absolut necesară deoarece oxalatul reacționează cu H_2SO_4 cu eliberare de acid oxalic care s-ar adăuga la acidul oxalic provenit din oxalatul de calciu și rezultatul va fi mai mare.

DOZAREA COMPLEXOMETRICA A Ca și Mg
DIN SER

Principiu

Ionii de Ca și Mg formează complexe coordinative stabile cu EDTA (etilendiamin-tetraacetat de sodiu) denumit comercial complexon III.

In serul total se dozează Ca și Mg. Paralel se face o altă probă pentru Mg cu ser din care Ca a fost precipitat cu oxalat de amoniu. Prin diferență se obține cantitatea de Ca.

Reactivi

1. Sol. tampon sulfamat de amoniu

sulfamat de amoniu	0,8 g
apă bidistilată	20 ml
amoniac pînă la	100 ml

2. Sol. indicator

roșu de metil	0,15 g
eriocrom T	0,05 g
alcool absolut pînă la	100 ml

3. Sol. EDTA 0,372 g %

4. Sol. clorură de calciu 100 mg %
 CaCO_3 0,250 g
 HCl N pînă la solvire
 apă bidistilată la 1000 ml
5. Acid oxalic 0,2 N
6. Amoniac

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de centrifugă se introduc 1 ml ser, 1 ml acid oxalic și 0,6 ml apă bidistilată, se agită și se lasă în repaus 5 minute. Se adaugă 0,4 ml amoniac și se lasă apoi în repaus o oră, după care se centrifughează la 2000 - 3000 t/m timp de 15 minute. În trei pahare Berzelius de 50 ml, notate A, B și C, se pipetează:

	A	B	C
	(Ca + Mg)	(Mg)	(Etalon)
	ml	ml	ml
Ser	0,5	-	-
Supernatant	-	1,5	-
Sol. CaCl_2	-	-	0,5
Sol. tampon	0,5	0,5	0,5
Indicator	0,25	0,25	0,25

Se titrează cu EDTA pînă la viraj verde.

Se notează:

- N = ml EDTA necesari pentru proba A
 N' = ml EDTA necesari pentru proba B
 n = ml EDTA necesari pentru proba C
 N - N' = ml EDTA necesari pentru dozarea Ca.

Calcul

Pentru calciu:

$$\frac{N - N'}{n} \times 0,05 \times 2000 = \text{mg Ca la } 1000 \text{ ml ser}$$

Pentru magneziu:

Dacă	1 mol Ca (40)	, ...	1 mol Mg (24)
	0,05 mg Ca		X

$$X = \frac{0,05 \times 24}{40} = 0,03 \text{ mg Mg corespunzător}$$

cantității de Ca din proba etalon.

$$\frac{N'}{n} \times 0,03 \times 2000 = \text{mg Mg la } 1000 \text{ ml ser}$$

Valori normale

Calciu: 90 - 100 mg % ml ser.

Magneziu: 19 - 25 mg % ml ser.

DOZAREA COMPLEXOMETRICA A Ca SI Mg
IN URINA

Principiu

Este același ca și la dozarea complexometrică a Ca și Mg în ser.

Reactivi

1. Sol. EDTA 0,186 g %
2. Sol. alcoolică roșu de metil 0,030 g %

In momentul întrebuintării se diluiază
1 : 20 în alcool.

3. Sol. alcoolică eriocrom T 0,103 g %

In momentul întrebuintării se diluiază

1. : 20. în alcool.

4. Sol. oxalat de sodiu

oxalat de sodiu

6,7 g

apă bidistilată

500 ml

roșu de metil

2 - 3 picături

acid acetic pînă la viraj roz

apă bidistilată pînă la 1000 ml

5. Sol. tampon de pH 10,8

acid sulfamic

1 g

piperazină

23 g

apă bidistilată

100 ml

6. Sol. etalon calciu 100 mg %

CaCO_3

0,250 g

HCl pînă la solvire

apă bidistilată pînă la 1000 ml

7. Acid acetic 10 %

Modul de lucru

Intr-un balon cotat de 25 ml se introduc 5 ml urină și 10 ml apă distilată, se adaugă acid acetic 10 %, pînă la colorația roz, în prezența roșului de metil (pH = 5,5). Se completează pînă la 25 ml cu apă distilată. Intr-o eprubetă de centrifugă se iau 1 - 2 ml urină diluată și aceeași cantitate de oxalat de sodiu, se lasă în repaus o oră și se centrifughează la 2000 - 3000 t/m.

In trei pahare Berzelius de 50 ml, notate A, B și C se pipetează:

	A (Ca + Mg) ml	B (Mg) ml	C (Etalon) ml
Urină diluată	1	-	-
Supernatant	-	2	-
Etalon calciu	-	-	0,5
Roșu de metil diluat	1	1	1
Eriocrom diluat	1	1	1
Tampon	0,5	0,5	0,5

Se titrează cu EDTA pînă la viraj verde.

Se notează:

N = ml EDTA necesari pentru proba A

N' = ml EDTA necesari pentru proba B

n = ml EDTA necesari pentru proba C

N - N' = ml EDTA consumați numai de Ca

Calcul

Pentru calciu:

$$\frac{N - N'}{n} \times 0,05 \times 5 \times 1000 = \text{mg Ca la } 1000 \text{ ml urină.}$$

Pentru magneziu:

$$\begin{array}{lcl} \text{Dacă: } 1 \text{ mol Ca (40)} & & 1 \text{ mol Mg (24)} \\ 0,05 \text{ mg Ca} & & X \end{array}$$

$X = 0,03 \text{ mg Mg corespunzător cantității de Ca din proba etalon.}$

$$\frac{N'}{n} \times 0,03 \times 5 \times 1000 = \text{mg Mg la } 1000 \text{ ml urină.}$$

Valori normale

Calciu : 0,15 - 0,20 mg % ml urină

Magneziu : 0,05 - 0,1 mg % ml urină.

Observații

Dacă urina conține depozit de oxalat de Ca și Mg, acesta este redizolvat cu o cantitate minimă de HCl, după care urina se filtrează.

DOZAREA FOSFORULUI ANORGANIC IN SER

(Metoda Bell Doisy Briggs)

Principiu

Fosforul anorganic din ser formează împreună cu acidul molidic, acidul fosfomolidic, care este redus de acidul ascorbic în albastru de moliden. Culoarea obținută este comparată cu cea a unei soluții standard de fosfat, tratată în aceleași condiții.

Reactivi

1. Sol. acid tricloracetic 20%

2. Sol. acid molidic

a) sol. molidat de amoniu	25 g
apă distilată	300 ml
b) sol. acid sulfuric	
apă distilată	125 ml
acid sulfuric	75 ml

După solvirea molidatului și răcirea soluției de acid sulfuric se amestecă soluțiile (a) și (b) și se completează la 500 ml cu apă distilată.

3. Sol. acid ascorbic 1% în HCl N/10

4. Sol. fosfat acid de potasiu (KH_2PO_4) 0,4394 g %.

Din această soluție se iau 25 ml și se completează la 200 ml cu apă distilată; 2 ml din această soluție corespund la 0,025 mg fosfor.

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de centrifugă se măsoară 2 ml ser. Se adaugă 2 ml acid tricloracetic. Se amestecă bine cu o baghetă. Se lasă în repaus 5 minute. Se centrifughează,

In următoarele eprubete de reacție se pipetează:

	Proba	Etalon	Mart.
	ml	ml	ml
Supernatant	2	-	-
Etalon	-	2	-
Acid molidic	2	2	2
Acid ascorbic	0,5	0,5	0,5
Apă distilată	5,5	5,5	7,5

Se citește densitatea optică a probei și etalonului față de martor la 630 nm

Calcul

$$\frac{E_P}{E_E} \times 0,025 \times 1000 = \text{mg fosfor la 1000 ml ser}$$

Valoarea normală

Ser adult 35 mg fosfor %

Ser copil 50 mg fosfor %

DOZAREA FOSFORULUI IN SER (Metoda fără deproteinizare)

Principiu

Fosforul, în mediu alcalin și în prezența unui reducător, formează cu molibdatul de amoniu un complex albastru deschis.

Reactivi

1. Soluție etalon fosfor 40 mg % (0,175 g % KH_2PO_4)

2. Sol. reducător:

hidrochinonă clorhidrat	2,085 g % (0,3 M)
polivinilpirolidonă	5 g % (0,002 M)
H_2SO_4 (0,09 M)	0,48 ml/100 ml apă

Se mai poate utiliza un alt reducător format

din: vitamina C	200 mg
polivinilpirolidonă	5 g
H_2SO_4	0,48 ml/100 ml apă

3. Sol. molibdat de amoniu 0,4078 g % (0,0033 M)

4. Sol. NaOH 16 g % (4 M)

Reactivii se pot conserva timp de un an, la temperatura camerei și la întuneric.

Modul de lucru

	Probă ml	Etalon ml	Martor ml
Soluție reducător	1	1	1
Apă distilată	2	2	2
Soluție molibdat de amoniu	0,5	0,5	0,5

Se agită bine și se adaugă:

ser	0,1	-	-
soluție etalon fosfor	-	0,1	-

Se agită, se lasă în repaus 2 minute și se adaugă:

Sol. NaOH	0,5	0,5	0,5
-----------	-----	-----	-----

Se amestecă. După 5 minute se citește la 700 nm, proba și etalonul față de martor.

Calcul

$$\frac{E_p}{E_{et}} \times 40 = \text{mg fosfor } \% \text{ ml ser}$$

Valori normale

Adult: 25 - 42 mg fosfor % ml ser

Copil: 59 mg fosfor % ml ser

Observații

Se poate doza și în urină. Se acidificază urina ajustînd pH-ul la 3 - 4 cu HCl N. Se diluiază 1/10 cu apă distilată și se efectuează dozarea ca la ser. În urină, valorile normale pot atinge 1000 mg în 24 ore.

DOZAREA FOSFORULUI ÎN URINA

Principiu

Fosfații din urină sînt precipitați la cald cu azotatul de uranil. Acidul azotic, eliberat din reacția de mai sus, este neutralizat prin adăugarea de acetat de sodiu. Sfîrșitul reacției se pune în evidență cu tinctură de coșenilă, care atunci cînd întreaga

cantitate de fosfat a precipitat, dă cu azotatul de uranil un complex de culoare verde.

Reactivi

1. Sol. azotat de uranil

Azotat de uranil

40 g

Apă distilată

600 ml

Se solvă. Se adaugă apoi, pînă la tulburare persistentă, amoniac picătură cu picătură. După aceea se adaugă acid acetic glacial picătură cu picătură, pînă la solvirea completă a precipitatului. Se completează apoi cu apă distilată pînă la 1000 ml.

2. Sol. Joulie

Acetat de sodiu

100 g

Acid acetic glacial

50 ml

Apă distilată pînă la

1000 ml

3. Sol. etalon fosfat de amoniu 3,24 g ‰

4. Tinctură de coșenilă în alcool de 96° soluție saturată

Modul de lucru

- Determinarea titrului soluției de azotat de uranil

Intr-o capsulă se pipetează:

Soluție etalon

50 ml

Soluție Joulie

5 ml

Tinctură de coșenilă pic.

4

Se încălzește la fierbere. Se agită cu o baghetă de sticlă. Se titrează în timpul fierberii, cu azotat de uranil, pînă la apariția culorii verzi. Se notează numărul de ml utilizați, cu n.

50 ml sol. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ = 0,10 g P_2O_5

Dacă n ml azotat de uranil ,cît s-au în-
trebuintat corespund la 0,10 g P_2O_5 ,atunci numai 1 ml
din soluția de azotat de uranil corespunde la $0,10/n =$
g P_2O_5 .

Rezultatul acestui raport este titrul so-
luției de azotat de uranil și indică cantitatea de
 P_2O_5 corespunzătoare la 1 ml din soluția de azotat de
uranil.

- Dozarea fosfaților în urină

Intr-o capsulă de porțelan se pipetează:

Urină 10 ml

Soluție Joulie 1 ml

Tinctură de coșenilă pic. 4

Se încălzește la fierbere.Se titrează cu
azotat de uranil pînă la culoarea verde.

Calcul

$N \times \text{titrul soluției de azotat de uranil} \times 100 =$
g P_2O_5 la 1000 ml urină.

Valori normale

2 - 4 g la 1000 ml urină exprimat în P_2O_5

Pentru a se exprima în acid ortofosforic se
înmulțește cu 14 valoarea în P_2O_5 .

Interpretare

Tulburările de metabolism ale calciului
se pot manifesta fie printr-o depleție,fie printr-o
retenție de calciu.Depleția de calciu se manifestă
prin rahitism la copil și osteomalacie la adult.

Osteomalacia se poate datora unei diete sărace în calciu, unei creșteri a nevoilor metabolice, unui defect de absorbție intestinală sau în urma pierderii exagerate de calciu.

Calcemia și fosfatemia sînt normale sau scăzute; fosfataza alcalină este crescută traducînd o activitate osteoblastică deosebită.

Calciuria este scăzută cu excepția osteomalaciei de excreție, unde este crescută.

În rahitism, Ca este normal pentru ca în timpul evoluției afecțiunii acesta să scadă și să apară fenomenul de tetanie. Fosforul este scăzut iar fosfataza alcalină este totdeauna crescută, fiind singura constantă biologică semnificativă.

Retenția de Ca se întâlnește în intoxicația cu vitamină D manifestată prin hipercalcemie care inhibînd secreția paratiroidiană generează hiperfosfatemia. În hipoparatiroidism, calcemia este scăzută, fosfatemia este crescută pînă la valori foarte ridicate iar fosfataza alcalină poate fi normală sau scăzută.

Depleția de magneziu ca și hipocalcemia poate sta la baza unor cazuri de tetanie. Relația Mg - Ca se conturează a fi de două categorii: acțiune sinergică (hipocalcemie și hipomagnezemie și invers) și acțiune antagonistă (agravarea efectelor toxice ale hipomagnezei prin dietă hipercalcică sau hiperfosfatică). Relația Mg- K este de tip antagonic. Hipomagnezemie se întâlnește în cursul

hiperparatiroidiei. Depleția de Mg a mai fost semnalată în unele cazuri de stress, neoplazii, pancreatite acute și cronice, toxemia de sarcină, arsuri, osteopatii. Retenția de Mg este întâlnită în acidoza diabetică netratată (când rinichiul nu poate excreta Mg), infecții cronice, rahitism ca și în hiperparatiroidism.

DOZAREA SULFURULUI SUB FORMA DE SULFATI
ANORGANICI IN URINA
(Metoda Gauvin)

Principiu

Clorhidratul de benzidină dă cu sulfații un precipitat de sulfat de benzidină, care prin hidroliză se descompune în benzidină și acid sulfuric ce este dozat acidimetric.

Reactivi

1. Sol. HCl N/10
2. Sol. benzidină 2 g ‰

Intr-un mojar se amestecă 2 g benzidină, 5 ml apă distilată adăugată picătură cu picătură pentru obținerea unei mase omogene și semilichide. Se trece amestecul cantitativ într-un balon cotat de 1 litru, se adaugă 2,5 ml HCl concentrat, se agită bine și se completează cu apă distilată la semn. Dizolvarea poate fi grăbită prin ușoară încălzire.

3. Sol. apoasă de α -dinitrofenol 0,05 g%
4. Sol. fenolftaleină, indicator
5. Sol. NaOH N/10

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de centrifugă se introduc:

urină	2 ml
benzidină	10 ml
α -dinitrofenol	0,2 ml

Se adaugă HCl picătură cu picătură agitând cu o baghetă pînă la dispariția culorii galbene a indicatorului. Se adaugă apoi încă 0,5 ml HCl spălînd bagheta. Se lasă în repaus 10 minute, se centrifughează la 3000 t/m timp de 15 minute, după care se decantează lichidul fără a antrena precipitatul. Precipitatul se reia într-un pahar cu 5 ml apă distilată și apoi se încălzește pe o baie de apă pînă la fierbere. Se adaugă 5 picături de fenolftaleină și se titrează soluția fierbinte cu NaOH N/10 pînă la viraj roz. Se notează cu N numărul de ml NaOH utilizați.

Calcul

$N \times 0,004 \times 500 = \text{g sulfatî la 1000 ml urină}$

Valori normale

553 mg sulf anorganic în urina din 24 ore sau
85 - 90 % din sulful total.

Interpretare

În intoxicația cu benzină și derivați de anilină, aceștia se elimină sub formă de derivați sulfonici scăzînd valoarea sulfatilor anorganici.

Această modificare este proporțională cu gravitatea intoxicației și poate fi pusă în evidență înaintea apariției anemiei și leucopeniei.

O creștere a sulfului urinar este întâlnită în cazul catabolismului proteic accelerat.

Creșteri nete a sulfaților întâlnim în nefritele cronice cu insuficiență renală.

DOZAREA REZERVEI ALCALINE

(Metoda Van Slyke)

Principiu

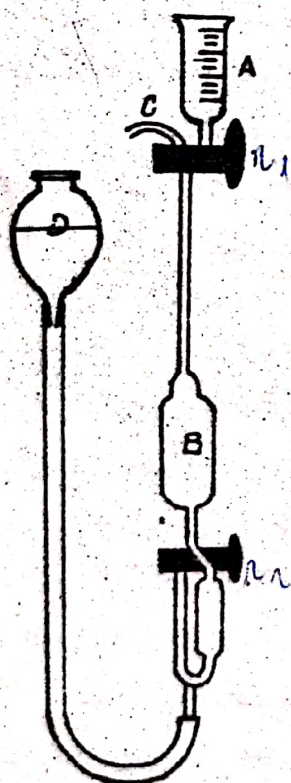
Se determină cantitatea de CO_2 degajată în vid de un volum cunoscut de plasmă după tratarea acesteia cu acid sulfuric.

Reactivi

1. Sol. acid sulfuric 5 %
2. Sol. amoniac 5 %
3. Alcool amilic

Modul de lucru

Intîi se ung robinetele aparatului cu vaselină. Se umple aparatul cu mercur atît în partea B



cît și para P. Se spală aparatul cu apă distilată fiartă introdusă prin A. Ambele robinete sînt deschise. Coborînd para P mercurul coboară din B și aspiră apa din A. Se coboară mercurul pînă la nivelul 50. Se elimină apa de spălare prin ridicarea pereii P și deschiderea robinetului R_1 în așa fel ca B să comunice cu tubul de scurgere C.

Se controlează apoi ca în aparat să nu fie aer. Pentru aceasta se aduce prin ridicarea pereii mercur în partea A, Robinetul R_1 trebuie să aibă o poziție care să permită comunicarea lui B cu A. Se închide robinetul R_1 și se lasă deschis robinetul R_2 . Se coboară para P pînă cînd mercurul din aparat ajunge la nivelul 50. Se ridică para P mai sus de robinetul R_1 . Dacă se aude un pocnet metalic atunci cînd mercurul izbește robinetul R_1 , înseamnă că în aparat este vid; dacă nu, se deschide robinetul R_1 , se scoate aerul și se repetă operația.

Se determină apoi rezerva alcalină din plasmă. Pentru aceasta se introduce în A 1 ml apă distilată fiartă și apoi cu mare precauție, fără a se amesteca se lasă cu o pipetă 1 ml plasmă.

Se deschide robinetul R_1 pentru a comunica A cu B, se lasă să curgă plasma și apa distilată în B cu precauție, pentru a nu pătrunde aer. În acest timp para P se lasă la un nivel inferior robinetului R_1 . Se introduc apoi cîteva picături de alcool amilic pentru a evita formarea spumei.

Se introduce apoi 1,5 ml din soluția de acid sulfuric în partea A a aparatului și se lasă să pătrundă în B cu grijă numai 1 ml. În A se introduce o cantitate mică de mercur care servește drept dop de siguranță.

Se coboară para P pînă ce mercurul ajunge la nivelul 50. În acest moment se închide robinetul R_2 al aparatului. Acum începe să se degaje

CO_2 în urma acțiunii H_2SO_4 asupra bicarbonaților. Pentru ca degajarea CO_2 să fie completă se agită aparatul timp de 3 minute.

Se deschide apoi robinetul R_2 și se introduce mercurul în partea B a aparatului prin ridicarea pereii P. Aceasta nu se va ridica mai mult peste nivelul mercurului. Când mercurul nu se mai ridică în aparat, atunci se aduce la nivelul mercurului din B și mercurul din para P. În felul acesta volumul CO_2 degajat se citește la presiunea atmosferică. După citirea volumului se scoate lichidul din aparat. Pentru aceasta se deschide robinetul R_1 în așa fel ca partea B a aparatului să comunice cu tubul de scurgere C; se ridică para P și prin C se scurge lichidul.

Se spală apoi aparatul. Pentru aceasta se introduce în A soluție de amoniac, se deschide robinetul R_1 soluția de amoniac pătrunzând în B. Se coboară para P pînă ce amoniacul ajunge la nivelul 50 apoi se ridică pînă la nivelul robinetului R_1 . Se repetă operația de cîteva ori. Se scoate apoi soluția de amoniac prin tubul de scurgere. Se clătește aparatul de mai multe ori cu apă și apoi cu apă distilată.

Se determină coeficientul de eroare al aparatului. Se procedează identic ca la plasmă cu deosebirea că în loc de plasmă se introduce 1 ml apă distilată. Se citește volumul de gaz degajat.

Calcul

($V - 0,12$ - coeficientul de eroare al aparatului) $\times 100 = \text{vol. CO}_2$ la 100 ml plasmă.



0,12 = coeficientul de corecție pentru presiune și temperatură.

Valori normale

Adult: 55 - 70 ml CO_2 /100 ml plasmă

Copil: 50 - 65 ml CO_2 /100 ml plasmă

DOZAREA REZERVEI ALCALINE

(Metoda titrimetrică)

Principiu

Bicarbonații din plasmă în prezența unui exces de H_2SO_4 cu titru cunoscut, formează sulfatul de Na și CO_2 . După îndepărtarea CO_2 format, cu ajutorul unui curent de aer, acidul sulfuric rămas ne-combinat este titrat cu NaOH în prezența roșului de fenol ca indicator.

Reactivi

1. Sol. acid sulfuric N/100.
2. Sol. NaOH N/100
3. Sol. clorură de sodiu 9 g %

Soluția se face cu apă distilată fiartă și răcită în prealabil, a cărei pH trebuie să fie 7,4. Corecția se face adăugându-se NaOH N/100 (0,3 - 0,4 ml NaOH N/100 la 100 ml soluție).

4. Sol. indicator - roșu de fenol 0,4 %:

roșu de fenol	0,4 g
NaOH N/10	12 ml
apă distilată pînă la	100 ml

In momentul întrebuințării, soluția de indicator se diluiază 1/20

5. Alcool octilic sau un alcool superior.

Modul de lucru

Intr-o eprubetă, considerată etalon, se introduce: 1 ml plasmă, 20 ml soluție clorură de sodiu și 1 ml soluție indicator. Se agită ușor pentru omogenizare.

Intr-o altă eprubetă, de același diametru cu cea pentru etalon, la care s-a notat în prealabil volumul de 21 ml, se introduce: 1 ml plasmă, 5 ml H_2SO_4 N/100 și o picătură de alcool octilic pentru împiedecarea formării spumei. Se introduce o pipetă efilată în fundul eprubetei prin care se trece un curent de aer, cu ajutorul unei pare de cauciuc sau prin racordare la un suflai, timp de 5 minute pentru îndepărtarea CO_2 format. Se adaugă apoi 1 ml indicator după ce s-a scos pipeta efilată. Se titrează cu NaOH N/100 pînă cînd se obține o tentă apropiată de cea a etalomului. Se completează cu soluție de clorură de sodiu pînă la volumul de 21 ml, apoi se continuă titrarea cu NaOH N/100 pînă la identitate de culoare.

Se notează cu N numărul de ml NaOH folosiți la titrare.

Calcul

$$22,4 (5 - N) = \text{ml } CO_2 / 100 \text{ ml plasmă}$$

22,4 = volumul ocupat de o moleculă gram de bioxid de carbon.

Valori normale55 - 65 ml CO₂ / 100 ml plasmăObservații

Determinarea poate fi făcută și în ser, cu condiția ca la rezultatul obținut prin calcul să se adauge a 20-a parte, cifră care reprezintă cantitatea de CO₂ liberă din sânge și care s-a pierdut deoarece nu a fost recoltat sub oleu de vaselină.

ANALIZA CHIMICA A SUCULUI GASTRIC

1. Dozarea acidității sucului gastric

În mod normal aciditatea sucului gastric se datorește acidului clorhidric.

Acidul clorhidric se găsește în sucul gastric sub formă liberă, iar o mică parte se mai găsește legat de proteine, formînd aciditatea clorhidrică combinată. Aciditatea clorhidrică liberă cu cea combinată formează aciditatea totală a sucului.

Datorită puternicii acidități a sucului gastric, acesta este aseptice. Atunci cînd aciditatea sucului gastric este mică, sau sucul gastric este anacid (aclorhidric), apare o floră fermentativă avînd ca rezultat apariția de acid lactic, acetic și butiric.

Principiu

Se titrează cu ajutorul unei soluții de hidroxid de sodiu N/10 mai întîi acidul clorhidric liber în prezența reactivului Linossier care virează la pH-ul de 3,5 și apoi acidul clorhidric combinat în prezența fenolftaleinei ca indicator, care virează la pH-ul de 8,2.

În locul reactivului Linossier, se poate utiliza reactivul Günsburg

Reactivi

1. Sol. hidroxid de sodiu 0,1 N
2. Reactiv Linossier

p-dimetil-aminoazobenzol	0,25 g
fenolftaleină	1 g



alocool de 96°

100 ml

3. Reactiv Günsburg

Se solvă 1 g vanilină și 2 g floroglucină în 30 ml alcool de 90° .

Modul de lucru

Se filtrează sucul gastric obținut prin tubaj în urma prinzului de probă. Din filtrat se iau într-un pahar Berzelius 10 ml. Se adaugă o picătură din reactivul Linossier. Dacă prin adăugarea reactivului se obține o culoare galbenă, înseamnă că sucul gastric nu conține acid clorhidric liber. Dacă se obține o culoare roz, atunci există acid clorhidric liber pe care îl titrăm, lăsând să curgă din biuretă NaOH 0,1N pînă la apariția culorii galben-portocaliu. Se notează numărul de ml utilizați.

Se continuă titrarea mai departe tot cu NaOH 0,1 N pînă la apariția unei culori roz. Se notează numărul de ml utilizați pentru a doua titrare.

Calcul

Stim că soluțiile de aceeași normalitate corespund volum la volum, astfel că 1 ml dintr-o soluție de HCl 0,1 N corespunde la 1 ml dintr-o soluție de NaOH 0,1 N. Dar 1 ml din soluția de acid clorhidric 0,1N conține 0,00365 g HCl . Înmulțind numărul de ml de NaOH utilizați la prima titrare cu 0,00365, se capătă cantitatea de acid clorhidric liber din 10 ml suc gastric. Dacă se face aceeași operație cu cantitatea de NaOH utilizați la a doua titrare, se obține cantitatea de acid clorhidric combinată din 10 ml suc gastric. În ambele cazuri se

înmulțește cu 100 pentru a avea la 1000 ml suc gastric

Se adună cantitatea de acid clorhidric liber cu cea combinată și se capătă aciditatea clorhidrică totală. Acidul clorhidric liber din suc gastric se poate identifica cu indicatori care au punctul de virare la pH-urile 3-4. Dintre aceștia se poate utiliza roșu de Congo, cu punctul de virare la pH-ul 3 și p-dimetil-aminoazobenzolul cu punctul de virare la pH-ul 2,9.

Valori normale

În suc gastric recoltat pe nemâncate, aciditatea totală este de 2 g %, iar aciditatea clorhidrică liberă este de 0,7 g %. După prânzul cu alcool, aciditatea este egală cu 1,8-2 g %, iar cea liberă cu 0,5-0,8 g %. După proba cu histamină aciditatea totală este egală cu 2-3 g %, iar cea liberă cu 1,7 g %.

2. Cercetarea acidului lactic în suc gastric

Principiu

Acidul lactic dă cu clorura ferică, în mediu de acid clorhidric, o colorație galbenă aurie.

Reactivi

1. Reactiv Berg

sol. clorură ferică 30 %	2 picături
acid clorhidric conc.	2 picături
apă distilată	100 ml

2. Reactiv Uffelman

sol. clorură ferică	2 picături
---------------------	------------

sol. fenol 4 %

20 ml

Modul de lucru

Se iau într-o eprubetă 10 ml reactiv Berg sau Uffelmann. Se adaugă 5- 10 picături din suc gastric. În prezența acidului lactic reactivul Berg se colorează în galben, iar reactivul Uffelmann trece din violet în galben.

Observații

Reactivul Berg este sensibil dar nu atât de specific, iar reactivul Uffelmann este mai specific, dar nu atât de sensibil.

L I C H I D U L C E F A L O - R A H I D I A N

În analiza biochimică a lichidului cefalo-rahidian distingem un examen macroscopic, un examen chimic și un examen microscopic. Lichidul extras prin puncție lombară poate prezenta diverse aspecte la examenul macroscopic.

1. Claritate. Lichidul cefalo-rahidian (LCR) este clar ca apa de stîncă, în stare normală ca și în meningitele cronice.

2. Tulbure. LCR poate fi tulbure din cauza unor reacții meningeale acute sau din cauza prezenței sîngelui. În ultimul caz, lichidul se centrifughează. Dacă se limpezește după centrifugare înseamnă că tulbureala s-a datorat existenței sîngelui în lichid.

3. Purulent. Lichidul este gălbui mai mult sau mai puțin gros.

4. Hemoragic. În acest caz va trebui să vedem dacă aspectul hemoragic al LCR nu se datorește provenienței sîngelui în urma puncției efectuate prin înțeparea unei vene a plexului meningeal.

Se poate face următorul diagnostic diferențial chiar în momentul puncției, cu ajutorul a trei eprubete în care se recoltează lichidul în mod succesiv. Dacă lichidul are o tentă sîngerîndă în toate cele trei eprubete, aceasta indică o hemoragie meningeală. Dacă aspectul hemoragic nu este continuu ne indică o

înțepare a unei vene.

5. Culoarea galbenă a lichidului cefalo-rahidian poate fi datorită următoarelor cauze:

a. În icter culoarea galbenă se datorește pigmentilor biliari.

b. În meningitele tratate cu ser, aspectul gălbui a lichidului se datorește serului injectat prin puncție și care nu a fost resorbit complet.

c. În hemoragii, compresiuni, tumori, aspectul galben se datorește trecerii serului sanguin în cavitatea rahidiană în urma tulburărilor circulatorii. În acest caz lichidul coagulează spontan și foarte repede.

d. În caz de hemoragii traumatice în care sîngele se transformă în bilirubină, aceasta imprimă lichidului o culoare galbenă fără a fi însă icter.

Caractere fizice

După cum s-a arătat mai sus, lichidul cefalo-rahidian este limpede, incolor, cu densitatea de 1002-1008 și un delta crioscopic de $-0,535^{\circ}$.

Caractere chimice și examenul chimic

Reacția LCR-lui este mai acidă decît a plasmei.

1000 ml de LCR conțin un reziduu uscat de 10 g din care 8,8 g sînt furnizate de materiile minerale și 1,2 g de materiile organice.

Astfel NaCl se află într-o concentrație de 7,2 g ‰, KCl 0,4 g ‰, glucoza 0,65 g ‰, acid lactic 0,13 g ‰, albumine 0,12 g ‰, uree 0,20 g ‰,

acid uric 0,005 g %, colesterol 0,0011, acizi grași 0,043 g % și fosfatide 0,0095 g %.

În timp ce umorile normale (sînge) sau patologice (exudate) conțin aceeași cantitate de glucoză ca în sînge, LCR-ul face excepție. Valoarea glucozei din LCR (glicorahia) variază în jurul cifrei de 0,50 g%, ceea ce face cam 1/2 din valoarea glicemiei. Totuși glicorahia deși nu se află la o valoare egală glicemiei, variază în raport cu aceasta. În hiperglicemie se găsește întotdeauna hiperglicorahie.

De asemenea clorurile se află într-o concentrație diferită în LCR față de sînge. Astfel în lichidul cefalorahidian clorurile exprimate sub formă de NaCl se află în concentrație de 7,30 g % pe cînd în plasmă nu ating decît 5,8 g %. Cît privește cantitatea de proteine acestea se află într-o cantitate foarte mică 0,16 - 0,25 g %.

Cercetarea hipo și hiper-glicorahiei

(Metoda Mestrezat)

Principiu

Se bazează pe reducerea licoarei Fehling de către glucoza din LCR.

Reactivi

1. Reactiv Fehling I

Sulfat de cupru	35 g
Apă distilată	200 ml
Acid sulfuric conc.	5 ml
Se completează cu apă distilată la 1000 ml.	

2. Reactiv Fehling II

Hidroxid de sodiu 30%	300 ml
Tartrat dublu de sodiu și K	150 g
Apă distilată pînă la	1000 ml

În momentul întrebuintării se amestecă părți egale de Fehling I și Fehling II.

Modul de lucru

a. Cercetarea hipoglicorahiei

Se iau într-o eprubetă 2 ml LCR și 0,2 ml soluție Fehling. Se agită și se ține într-o baie de apă care fierbe timp de 5 minute. Un lichid normal dă o reducere masivă.

b. Cercetarea hiperglicorahiei

Intr-o eprubetă se introduc 0,6 ml LCR, 2 ml apă distilată și 1 ml soluție Fehling. Se agită și se ține la baie de apă care fierbe timp de 5 minute. Un lichid normal nu dă nici o reacție de reducere; un precipitat vizibil (examinarea se face pe fond negru) se produce pentru o concentrație ce depășește 0,7 g%

Observații

Un lichid de meningită dă o reducere foarte slabă sau nulă cînd LCR-ul este examinat prin metoda pentru cercetarea hipoglicorahiei.

Se constată o scădere și chiar o dispariție a glicorahiei în cursul meningitelor acute mai ales cele cu meningococi. Dispariția completă este regulă în primele 24 ore, mai ales în meningitele cu lichid tulbure. Creșterea glicorahiei în L C R se constată la

diabetici, în encefalita epidemică și în poliomielită.

CERCETAREA CALITATIVA A ALBUMINELOR
(Reacția Pandy)

Principiu

Albuminele precipită în prezența fenolului.

Reactivi

1. Sol. fenol:

fenol	10 g
apă distilată pînă la	100 ml

Se agită bine și se ține la termostat la 37°C timp de cîteva ore, apoi cîteva zile la temperatura camerei. Soluția fiind saturată cu fenol va depune un precipitat. Se decantează partea de deasupra, care este limpede și care constituie reactivul propriuzis.

Modul de lucru

Pe o sticlă de ceas, care pentru o mai bună observare se așează pe un fond negru, se pune o cantitate redusă de soluție de fenol. Dintr-o pipetă se lasă să cadă o picătură de ICR. Dacă apare o slabă turbiditate la limita de contact a lichidului cu reactivul, reacția este socotită normală. Dacă turbiditatea este mai intensă, în funcție de intensitate se notează cu +, ++, +++.

CERCETAREA GLOBULINELOR

(Reacția Nonne - Apeld)

Principiu

Globulinele precipită în prezența unei soluții saturate de sulfat de amoniu.

Reactivi

1. Sol. saturată de sulfat de amoniu:

sulfat de amoniu	80 g
apă distilată	100 ml

Se agită, se încălzește pînă la solvire completă, se lasă să se răcească în parte și se filtrează soluția caldă. Filtratul constituie reactivul.

Reactivul trebuie să aibă o reacție ușor alcalină și de aceea se va controla pH-ul; dacă pH-ul este acid - deoarece sulfatul de amoniu are o reacție ușor acidă se va alcaliniza cu cîteva picături de NH_3 în prezența hîrtiei de turnesol.

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de hemoliză se ia un volum de LCR și un volum din reactivul proaspăt filtrat. Se agită și se lasă eprubeta în repaus timp de 5 - 10 minute. Citirea reacției se face pe un fond negru. Lichidul clar sau ușor opalescent indică o reacție normală. Dacă opalescența crește în intensitate, se notează cu ++, precipitarea cu +++ și precipitarea puternică cu ++++.

DOZARE. PROTEINORAHIEI

(Metoda Sicard - Cantaloub)

Principiu

Proteinele din LCR sînt precipitate cu acid tricloracetic, la cald. Cantitatea de proteine este apreciată prin măsurarea volumului precipitatului.

Reactivi

1. Sol. acid tricloracetic 33 g %

Modul de lucru

Intr-un rahialbuminometru Sicard - Cantaloub se introduce LCR pînă la diviziunea 4 și se încălzește pînă aproape de fierbere. Se adaugă 12 picături soluție tricloracetic, se agită și se lasă în repaus timp de 5 minute. Rahialbuminometrul se agită prin răsturnare și se așează în poziție verticală. Se citește nivelul precipitatului după 5 ore. Diviziunile de pe rahialbuminometru indică proteinele în g % după cum urmează:

- 1 diviziune = 0,22 g % proteine
- 2 diviziuni = 0,40 g % proteine
- 3 diviziuni = 0,56 g % proteine
- 4 diviziuni = 0,71 g % proteine
- 5 diviziuni = 0,85 g % proteine

Dacă precipitatul depășește această limită LCRul se diluiază de două sau trei ori, la calcul ținînd seama de diluție.

DOZAREA PROTEINELOR TOTALE

(Metoda Daughaday)

Principiu

Proteinele dau reacție de culoare cu reactivul biuret, intensitatea fiind sporită prin reacția cu fenol a lui Folin - Ciocîlteu.

Reactivi

1. Sol. carbonat de sodiu 2 g % în NaOH 0,1 N
2. Sol. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g % în citrat de sodiu 1 g %
In momentul întrebuintării se ia 1 ml din soluția de CuSO_4 și 49 ml din soluția de Na_2CO_3 .
3. Sol. fenolică după Folin - Ciocîlteu

In momentul întrebuintării se diluiază 1/3

4. Sol. clorură de sodiu 9 g %

Modul de lucru

In următoarele eprubete se pipetează:

	Martor	Probă
	ml	ml
Amestec Na_2CO_3 și CuSO_4	-	5
ICR	-	0,1
Se agită, se lasă în repaus 10 minute.		
Reactiv Folin - Ciocîlteu	-	0,5
Sol. clorură de sodiu	5,5	-
ICR	0,1	-

Se agită și se lasă în repaus două ore la temperatura laboratorului.

Se citește extincția probei față de a martorului la 620 nm sub o grosime de strat de 1 cm.

Calcul

$(E_p - 0,014) \times 255,1 = \text{proteine în mg \%}$.

Valori normale

17 - 34 mg \% proteine

Observații

Se poate folosi o curbă etalon stabilită cu ajutorul unei soluții de albumină sau cu un ser a cărui concentrație în proteine totale a fost determinată prin metoda Parnas - Wagner.

Interpretare

Proteinorahia este crescută în toate afecțiunile sistemului nervos central, mai ales în paralizia generală și în meningite. În genere cantitatea de globuline este mult crescută.

De asemeni proteinorahia poate fi crescută în totate afecțiunile meningeale acute sau cronice.

Albuminorahia crescută poate fi însoțită de limfocitoză ca în meningita acută, tuberculoză și poate fi fără limfocitoză ca în compresiuni meningeale și în tumori.

Poliradiculonevrita prezintă o proteinorahie crescută. În parkinsonism postencefalic ca și în sindromul Meniere proteinorahia este în limite normale.

În herpes zoster proteinorahia a fost găsită în ușoară creștere.

PROBA REDUCERII PERMANGANATULUI DE POTASIU.
(Tehnica P.Ferencz)

Principiu.

L.C.R prezintă proprietatea de a reduce permanganatul de potasiu într-un timp determinat.

Reactivi.

1. Sol. permanganat de potasiu 1,5 ‰

Modul de lucru.

Intr-o eprubetă de reacție se introduce

L.C.R 1 ml

permanganat 0,1 ml

Se agită și se lasă în repaus la temperatura laboratorului, notându-se timpul până la virajul tentei violet a permanganatului la galben.

Valori normale.

Timpul de decolorare = 120 secunde.

Interpretare.

Alterarea sistemului nervos duce la scurtarea timpului de reducere a permanganatului. In meningitele acute reducerea este instantanee. In toxicoze, la copii, timpul de reducere este asemănător ca în meningitele acute.

In evoluții favorabile timpul de reducere se alungește. După vindecarea clinică timpul de reducere rămâne inferior timpului normal.

Paralel cu aceste modificări întâlnim și o creștere a acidului uric din L.C.R.

ANALIZA BIOCHIMICA A URINII

Determinările calitative se pot efectua pe urina proaspătă când cercetăm elementele patologice și sedimentul urinar.

Determinările cantitative se execută însă pe urina din 24 ore recoltată cu antiseptic.

Recoltarea se face în felul următor: prima urină de dimineață se aruncă și apoi începînd de ex. de la ora 8 dimineața pînă a doua zi la aceeași oră, se colectează toate emisiunile într-un vas curat, cu antiseptic (timol, toluol, oxiciamură de mercur soluție 1 %) pentru a împiedeca fermentația.

EXAMENUL FIZIC AL URINII

Aspectul

În mod normal, urina este limpede. Dacă la emisie ea este clară dar se tulbură prin răcire formînd un precipitat ce se depune sub formă de depozit, aceasta indică prezența fosfaților de calciu și magneziu, carbonați sau urați acizi.

Unele urini, însă, pot fi tulburi chiar la emisie datorită prezenței puroiului, hematiilor, celulelor epiteliale.

Deoarece pe urinile tulburi nu se fac

analize, trebuie ca mai întâi să o clarifiem. Prin filtrare și centrifugare se pot îndepărta elemente ca: leucocite, hematii, epiteliu, cilindri.

Urinile acide pot prezenta un depozit roz datorită uratului amorf ce se solvă la încălzire.

În urinile alcaline, un depozit gros, albicios indică prezența fosfaților. În acest caz urina se acidifică cu acid acetic 1/10.

O urină tulbure datorită bacteriilor se poate clarifica prin agitare cu talc și apoi filtrare.

Numai determinarea acidității urinare se va face întotdeauna asupra urinei ca atare, deoarece adăugarea de acid sau bază modifică aciditatea.

Culoarea

În mod normal urina are o culoare galben roșietică datorită pigmentilor existenți: urocromul, urobilina, uroeritrina, porfirina. Intensitatea colorației poate fi în funcție de concentrarea ei și de pH. Urinile acide au culoarea mai închisă spre deosebire de cele alcaline care sînt mai palide.

Urina capătă o culoare brună cînd pigmentii biliari sînt prezenți, roșietică dacă conține sînge sau în urma administrării unor medicamente ca piramidon, aspirină, etc.

În insuficiența renală gravă se elimină o urină palidă ca urmare a pierderii capacității rinichiului de a transforma cromogenii în pigmenti.

Mirosul

Mirosul urinei este caracteristic, ușor aromatic datorită acizilor volatili sau existenței unei substanțe numită "urinod". El este slab la emisie și se dezvoltă în timp. Prezența corpiilor cetonici în urină îi imprimă un miros de fructe, iar după ingestia de sparanghel apare un miros neplăcut și pronunțat.

Volumul

În mod normal volumul urinei variază în 24 de ore cu cantitatea de lichide ingerate precum și cu eliminarea de apă pe alte căi: transpirație, intestin, plămân.

La omul adult cantitatea de urină din 24 de ore este cuprinsă între 1200-1500 ml. Cantitatea de urină poate crește în anumite stări patologice ca: diabet, scleroză renală, sau poate scădea foarte mult ca în nefroze, nefrita toxică, diaree.

Densitatea

Ea variază în mod normal între 1015-1025; poate varia în funcție de apa ingerată și eliminată pe altă cale decât rinichii. Normal la un volum mare, densitatea scade, iar la un volum mic ea crește. Găsim o excepție în diabetul zaharat în care cu toate că volumul este crescut, densitatea este și ea crescută datorită eliminării de glucoză.

Determinarea densității urinare se face obișnuit cu ajutorul urodensimetrului. Se toarnă urina cu grijă pentru a nu face spumă, într-un cilindru cu

un diametru mai mare ca al urodensimetrului, pentru a nu împiedeca plutirea acestuia și de a nu adera de pereți. Citirea se face în așa fel încât nivelul superior al lichidului să fie la nivelul ochilor. Gradațiile urodensimetrului sînt socotite pentru temperatura de 15°C . Dacă urina are o temperatură mai ridicată de 15°C , se adaugă 0,001 pentru fiecare 3° în plus și se scade 0,001 pentru fiecare 3° în minus.

Prezența albuminei, modifică densitatea urinei numai dacă ea depășește 7 g %. În acest caz se vor scădea cîte 0,03 de fiecare gram de proteină în plus.

pH-ul urinei

În mod normal reacția urinei este ușor acidă, pH-ul ei fiind cuprins între 5,8 - 6. pH-ul urinei variază în funcție de regimul alimentar. Un regim bogat în carne produce o scădere a pH-ului iar unul vegetarian produce o creștere a alcalinității.

Cercetarea pH-ului urinar se poate face prin mai multe metode:

1. Cu hîrtie de turnesol,

Se înmoaie o hîrtie de turnesol roșie și una albastră în urină. Urina acidă înroșește hîrtia albastră iar una alcalină albăstrește pe cea roșie. La neutralitate culoarea hîrtiei nu se modifică.

2. Metoda colorimetrică (Guillaumin)

Principiu

Se determină colorimetric pH-ul urinei față de o scară cu pH-uri cuprinse între 4,6 - 7,4.

Reactivi

1. Indicator roșu de metil

roșu de metil mojarit	0,025 g
alcool de 96°	60 ml
apă distilată	40 ml

2. Indicator albastru de bromtimol

albastru de bromtimol	0,08 g
hidroxid de sodiu N/20	1,9 ml
alcool de 96°	10 ml
apă distilată	88 ml

3. Sol. KH_2PO_4 M/15

9,078 g ‰

4. Sol. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

23,86 g ‰

Sșara etalon: se iau 8 eprubete de același diametru. Se numerotează. In fiecare eprubetă se introduc cantitățile de fosfați indicate în tabel.

Nr. eprubetei	Sol. KH_2PO_4	Sol. Na_2HPO_4	pH-ul
	ml	ml	
1	10	-	4,6
2	9,85	0,15	5,0
3	9,55	0,45	5,4
4	9,15	0,85	5,8
5	8,05	1,95	6,2
6	6,30	3,70	6,6
7	3,70	6,30	7,0
8	1,90	8,10	7,4

Se introduce în fiecare eprubetă cîte 5 picături soluție roșu de metil și 5 picături soluție albastru de bromtimol.



Se închid eprubetele cu dop de cauciuc, se parafinează și se păstrează la întuneric.

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de același diametru cu cele din scară se pun 10 ml urină. Se introduc 5 picături roșu de metil și 5 picături albastru de bromtimol. Se agită și se compară cu scara de pH și se citește direct valoarea pH-ului.

EXAMENUL CHIMIC AL URINII

Cercetarea calitativă a proteinelor

1. Metoda cu acid acetic la cald

Intr-o eprubetă se iau 10 ml urină filtrată sau centrifugată. Se încălzește urina la partea superioară. Dacă apare o tulburare, aceasta poate fi datorată a două cauze: precipitarea fosfaților sau precipitarea proteinelor. Pentru diferențiere se adaugă câteva picături de acid acetic glacial. Dacă precipitatul dispare, înseamnă că era datorat fosfaților iar dacă persistă înseamnă că sînt proteine.

2. Metoda cu acid azotic (Heller)

Principiu

Proteinele precipită cu acid azotic concentrat.

Modul de lucru

Intr-o eprubetă de hemoliză se ia 1 ml de

HNO_3 conc. și cu ajutorul unei pipete se prelinge pe pereții interiori ai eprubetei, cu atenție, 1 ml urină filtrată în așa fel încât cele două lichide să nu se amestece. Dacă la limita de separație a celor două straturi apare un inel alb de precipitare, înseamnă că proteinele sînt prezente. Pseudoalbuminele pot da un inel de precipitare deasupra liniei de separare a celor două lichide.

3. Metoda cu acid sulfo-salicilic

Intr-o eprubetă se iau cîtiva ml urină filtrată peste care se adaugă 8 - 10 picături de acid sulfo-salicilic 20 %. Se agită. Apariția unui precipitat indică prezența proteinelor.

4. Metoda Esbach

Principiu

Albuminele precipită cu reactivii alcaloizilor, de exemplu, acid picric în prezența acidului citric.

Reactivi

1. Reactiv Esbach

acid picric	10 g
acid citric	20 g
apă distilată	1000 ml

Modul de lucru

La 2-3 ml urină filtrată se adaugă tot atîta reactiv Esbach. Apariția unui precipitat indică

fie prezența proteinelor, fie prezența pseudoalbuminelor. Dacă prin încălzire precipitatul dispăre înseamnă că au fost pseudoalbimine, iar dacă precipitatul persistă, el este datorit proteinelor.

Determinarea cantitativă a proteinelor

Evaluarea cantității de proteină din urină se poate face prin mai multe metode, dar cea mai utilizată și mai comodă este metoda Esbach,

Reactivi

1. Reactiv Esbach

Modul de lucru

În eprubeta gradată a albuminometrului se pune urină limpede până la semnul U. Se introduce apoi reactiv Esbach până la diviziunea R. Se închide, se agită și se lasă în repaus 24 ore în poziție verticală. Se citește apoi nivelul la care a ajuns precipitatul.

Concentrația în g % de proteină este dată direct de cifra citită la albuminometru.

Când cantitatea de albumină este mare, urina trebuie diluată cu apă distilată și apoi pusă la dozat. La citire se ține seama de diluția făcută.

Cercetarea proteinei Bence - Jones

Proteina Bence - Jones este o paraproteină ce apare în anumite stări patologice (mielom).

Principiu

Prin încălzirea la 50-60°C a urinei se formează un precipitat ce dispare când temperatura crește pînă la 100°C și reapare la răcire.

Reactivi

1. Acid acetic 10 %

Modul de lucru

Se introduce o eprubetă cu cîtiva ml de urină în baia de apă și se încălzește foarte încet. Dacă proteina Bence - Jones este prezentă, apare un precipitat între 50°-60°C.

Se acidulează urina cu acid acetic 10 % și se continuă încălzirea pînă la fierbere. Precipitatul dispare total sau parțial. Prin răcirea urinei, precipitatul reapare.

Cercetarea glucozei

(Reacția Benedict)

Principiu

Se bazează pe reacția de reducere a cuprului.

Reactivi

1. Reactiv Benedict

Sol. A citrat de sodiu	85 g
carbonat de sodiu	50 g
apă distilată	400 ml
Sol. B sulfat de cupru	8,5 g
apă distilată	50 ml

Se amestecă soluțiile A și B și se filtrează.

Modul de lucru

Se iau într-o eprubetă 5 ml reactiv Benedict și 8 picături din soluția care conține glucoză. Fierbem 2 minute sau punem la baie de apă 5 minute. Dacă soluția conține glucoză se va obține un precipitat a cărui culoare ne va indica cantitatea de glucoză în mod aproximativ:

- până la 1 g glucoză % - opalescență verde

- 10-20 g glucoză %-precipitat galben

- peste 25 g glucoză %-precipitat roșu

Cercetarea acetonei

(Metoda Imbert - Bonnamour)

Principiu

Acetona cu amoniacul și cu nitroprusiatul de sodiu dă o culoare roșie - violacee.

Reactivi

1. Acid acetic glacial
2. Sol. nitroprusiat de sodiu 10 g %
3. Amoniac

Modul de lucru

Se iau într-o eprubetă 10 ml urină, 10 picături de acid acetic glacial și 10 picături din soluția de nitroprusiat. Se agită. Se lasă apoi la suprafața lichidului, cu precauție ca să nu se amestece, 20 picături de amoniac. În caz că acetona este

prezentă, se observă un inel roșu-violet la limita de separare între cele două lichide.

Observații

Reacția poate fi dată și de unele substanțe medicamentoase, ca de exemplu salicilatul, aspirina, etc. Pentru diferențiere se vor lua în eprubetă 10 ml urină care se vor fierbe. Prin fierbere acetona dispare. Dacă, făcându-se proba după fierbere, reacția este negativă, înseamnă că reacția pozitivă a fost dată de acetonă.

Cercetarea pigmentilor biliari

(Reacția Gmelin - metoda Rosenbach)

Principiu

Bilirubina în contact cu acidul azotic care conține o cantitate mică de acid azotos, dă culorile verde, albastru, violet, roșu și galben ce apar succesiv și care corespund la diferite faze de oxidare ale bilirubinei.

Reactivi

1. Acid azotic concentrat
2. Nitrit de sodiu cristalizat

Modul de lucru

Se filtrează o cantitate de urină proaspăt emisă. Filtrul se întinde pe o placă de porțelan. Intr-o eprubetă se iau 5 ml acid azotic și un cristal de nitrit de sodiu. Se agită. Din această soluție se ia o picătură și se depune pe hîrtia de filtru, în mijlocul ei.

În prezența bilirubinei apare o pată roz. Pe măsură ce acidul va difuza în hîrtia de filtru, pată roz va fi înconjurată de aureole violete, albastre și verzi.

Reacția Zins

Principiu

Se extrage bilirubina din urină cu clorură de bariu în azotit de sodiu sub formă de bilirubinat de bariu. Acesta tratat cu o soluție de acid tricloracetic dă o culoare verde.

Reactivi

- 1, Sol, azotit de sodiu 1 g %
- 2, Sol. acid triclor acetic 20 g %
3. Clorură de bariu cristale

Modul de lucru

Intr-o eprubetă se iau 10 ml urină. Se adaugă 2-5 picături din soluția de nitrit de sodiu și câteva cristale clorură de bariu. Se agită puternic. Se filtrează. Pe filtru rămîne precipitatul de bilirubinat de bariu. Se întinde filtrul pe o placă de porțelan și peste el se adaugă o picătură din soluția de acid tricloracetic. În prezența unor cantități foarte mici de bilirubină apare o colorație verde. În prezența urobilinei apare o colorație violetă.

În mod normal urina nu conține pigmenți biliari. Cînd sînt prezenți, aceștia imprimă urinei o culoare galben-brună asemănătoare cu berea neagră.

Pigmenții biliari apar în urină în ictere mecanice atunci când canalul coledoc este obturat. În acest caz bilirubina este însoțită de prezența acizilor biliari. În icterele hemolitice bilirubina nu este însoțită de prezența acizilor biliari (colalurie)

Observații

Când se cercetează urme de bilirubină, urina trebuie colectată într-un vas care conține câteva cristale de clorură de Ba și la adăpost de lumină și aer.

Cercetarea urobilinogenului

Principiu

Reactivul Ehrlich (p-dimetilamino-benzaldehidă) formează cu urobilinogenul un complex de culoare roșie.

Reactivi

1. Reactiv Ehrlich

p-dimetilamino-benzaldehidă	2 g
acid clorhidric 20 %	200 ml

Modul de lucru

Intr-o eprubetă se iau câțiva ml de urină și se adaugă câteva picături reactiv Ehrlich. Dacă în 1 - 2 minute nu apare o colorație roșie, se încălzește puțin pe baia de apă. Apariția culorii roșii indică prezența urobilinogenului.

Această culoare roșie poate fi dată și de diferite substanțe ca: sulfamide, indican, etc., de aceea pentru a fi siguri că este urobilinogen se

va controla urina spectroscopic. In prezența urobilinogenului apare o bandă de absorbție în galben.

In mod normal urina conține urobilinogen în cantitate foarte mică, 20 - 25 mg în urină din 24 ore, totuși suficientă pentru a da reacția pozitivă.

Observații

Reacția pentru urobilinogen va fi făcută imediat după emisia urinei, deoarece în contact cu aerul urobilinogenul se oxidează în urobilină.

Cercetarea urobilinei

(Reacția Schlessinger)

Principiu

Urobilina dă cu acetatul de zinc în mediu alcoolic, la lumina ultravioletă, o fluorescență verde.

Reactivi.

1. Sol. alcoolică de acetat de zinc 10 g %
2. Sol. clorură de calciu 10 g %
3. Acid acetic glacial
4. Sol. amoniac 20 %

Modul de lucru

Se iau într-o eprubetă 2 ml urină și 2 ml soluție acetat de zinc. Se amestecă, se filtrează și se examinează la lumina ultravioletă pe fond negru. O fluorescență verde indică prezența urobilinei.

Observații

Dacă urina conține bilirubină, aceasta se îndepărtează astfel: la 2 ml urină se adaugă 2 ml soluție clorură de calciu și 2 ml soluție de amoniac. Se agită și apoi se filtrează. În filtrat se adaugă

cîteva picături de acid acetic pentru acidifiere și se face apoi reacție ca mai sus.

Acizii și sărurile biliare

Cercetarea acizilor și a sărurilor biliare în urină se face prin metode bazate fie pe reacțiile de culoare pe care le dau acizii biliari, fie pe faptul că sînt substanțe tensioactive care micșorează tensiune superficială.

Proba Hay (Metoda Predtecenschi)

Principiu

Prezența acizilor biliari în urină face să scadă tensiunea superficială. Această se pune în evidență cu floare de sulf care plutește deasupra apei și cade la fund cînd tensiunea superficială scade.

Reactivi

1. Sol. hidroxid de sodiu N/10
2. Sol. fenolftaleină indicator
3. Floare de sulf

Modul de lucru

Intr-un cilindru de sticlă se introduce urină, cîteva picături de fenolftaleină și se neutralizază cu soluție de hidroxid de sodiu. Se lasă pentru cîteva ore la gheață. Se presară apoi puțină floare de sulf. Cînd floarea de sulf se scufundă imediat, acizii biliari sînt în cantitate mai mare de 0,1 g %.

Cînd floarea de sulf se scufundă după o ușoară agitare, acizii biliari sînt într-o concentrație de 0,1 - 0,025 g %.

Cînd floarea de sulf nu se scufundă după agitare și continuă să plutească, acizii biliari sînt absenți.

Reacția de culoare Petenkofer

Principiu

Acizii biliari dau cu acidul sulfuric și levuloza o colorație roșie-violetă. Levuloza cu acidul sulfuric trece în oximetil-furfurol care cu acidul colic dă un compus colorat roșu-violet.

Reactivi

1. Acid sulfuric concentrat
2. Sol. levuloză 10 g %

Modul de lucru

Intr-o eprubetă se pipetează 1 ml urină peste care se adaugă apoi cîteva picături din soluția de levuloză. Se amestecă, se introduce la fundul eprubetei 1 ml acid sulfuric. La limita de separare, atunci cînd urina conține acizi biliari sau săruri biliare, apare un inel violet.

Observații

In loc de soluție de levuloză se poate utiliza și o soluție de zaharoză 20 g %.

Această reacție nu este reacția furfurolului dată de glucide cu acidul sulfuric deoarece reacția respectivă dă o colorație galben - cărămizie, pe cînd acizii biliari dau colorația roșie-violetă.

Interpretare

Prezența acizilor și a sărurilor biliare (colalurie) se observă în două cazuri:

În ocluzia canalului coledoc conținutul nu mai ajunge în intestin ci se resoarbe în ficat și trece în sânge, de unde acizii și sărurile biliare ajung în urină.

În leziunile anatomice și alterațiunile funcționale ale ficatului când celula hepatică este incapabilă să fixeze sărurile biliare.

Colaluria însoțește icterul. Către sfârșitul icterului, pigmentii biliari sunt eliminați în cantitate mai mare decât acizii biliari deoarece după un timp organismul este lipsit de acizi biliari care sunt eliminați anormal prin urină și care se refac mai greu decât pigmentii biliari.

Pigmentii biliari deși sunt eliminați la fel ca și acizii biliari sunt mereu formați de către ficat din hemoglobina sîngelui, eliminîndu-se de obicei prin intestin sub formă de stercobilină.

Cercetarea indicanelor în urină

(Reacția Jaffé)

Principiu

Indicanul în prezența acidului clorhidric este oxidat de clorura de calciu, apa oxigenată sau permanganat, în indigo albastru care colorează cloroformul în albastru.

Reactivi

1. Cloroform
2. Sol. clorură de calciu 5 g %
3. Acid clorhidric concentrat
4. Sol. permanganat de potasiu 2 g %
5. Apă oxigenată

Modul de lucru

Intr-o eprubetă se iau 5 ml HCl, se adaugă apoi 4 ml cloroform și 2 - 3 picături din una din soluțiile: apă oxigenată, permanganat sau clorură de calciu. Se amestecă prin răsturnare fără agitare puternică. În prezența indicelui se produce o colorație violetă în partea apoasă și albastră în partea cloroformică.

Observații

Adăugarea oxidantului se face cu atenție, câte puțin, deoarece surplusul oxidează indicul în isatină care este incoloră. Reacția este cu atât mai intensă cu cât cantitatea de indicul este mai mare.

Dozarea acidității urinarePrincipiu

Aciditatea urinară este dată de fosfații monobazici și de grupările $-COOH$ ale aminoacizilor.

Aciditatea dată de fosfați se poate titra direct cu NaOH și se numește aciditate de titrare, iar aciditatea dată de aminoacizi se titrează numai după blocarea grupărilor $-NH_2$ cu formol (aciditate formol).

Reactivi

1. Sol. hidroxid de sodiu N/10
2. Sol. formol 20 % neutralizată în prezența fenolftaleinei.
3. Sol. fenolftaleină 1% în alcool de 60°

Modul de lucru

Se recoltează urina din 24 ore cu antiseptic (oxicianură de mercur).

Intr-un balon Erlenmeyer se pipetează: 10 ml urină, 30 ml apă distilată și 1-2 picături de fenolftaleină. Se titrează cu NaOH N/10 până la viraj slab roz. Se notează numărul de ml de NaOH utilizați cu N.

Se adaugă apoi 5 ml formol. Se titrează mai departe tot cu NaOH N/10 până la viraj roz intens. Se notează numărul de ml utilizați cu N'.

Calcul

Aciditatea urinară se exprimă, în mod convențional în ml soluție de NaOH normală.

Aciditatea de titrare = $N \times 10 = \text{ml NaOH}$ N la 1000 ml urină.

Aciditatea formol = $N' \times 10 = \text{ml NaOH}$ N la 1000 ml urină.

Aciditatea totală = aciditatea de titrare + aciditatea formol.

Valori normale

Aciditatea de titrare = 25 ml NaOH N la 1000 ml de urină.

Aciditatea formol = 35 ml NaOH N la 1000 ml
de urină.

Raportul: aciditate de titrare / aciditate
formol $\times 100 = 60 - 70$ în mod normal.

M A T E R I I L E F E C A L E

Materiile fecale constituie produsul de excreție intestinală. Se compun din substanțe alimentare nedigerate sau incomplet digerate, celule descumate de pe mucoasa tubului și glandelor intestinale, microbi intestinali. În mod patologic materiile fecale pot conține sânge, puroi, paraziți intestinali.

EXAMENUL MICROSCOPIC

Principiu

Se examinează la microscop materiile fecale recoltate în a patra zi de regim Schmiđt.

Reactivi

1. Sol. Lugol

iod resublimat	1 g
iodură de potasiu	2 g
Apă distilată	50 ml

2. Sol. sudan III

sudan	1 g
alcool de 70°	100 ml

Modul de lucru

Se ia o mică cantitate de materii fecale și se așează pe o lamă. Se acoperă apoi cu o lamelă prin presare în așa fel ca să fie un strat subțire de materii fecale. Pe o altă lamă se ia o aceeași cantitate de materii fecale, se acoperă cu 2 picături de Lugol și se așează apoi lamela. Acest preparat servește pentru

a se examina prezența amidonului. Pe o a II-a lamă se procedează identic cu deosebirea că în loc de Lugol se pune soluție sudan III. Această lamă servește pentru cercetarea grăsimilor.

Se examinează apoi la microscop aceste preparate. În mod normal trebuie să se vadă foarte puține resturi alimentare iar restul să fie format din celule intestinale descuamate, microbi, resturi alimentare amorfe.

În mod patologic se pot găsi fibre musculare care sînt colorate de pigmentii biliari și apar cu striatiuni longitudinale, cu aspect cilindric. Prezența fibrelor musculare în materiile fecale denotă o insuficiență pancreatică mai ales cînd se observă și nucleii. Lipsa nucleilor, dar prezența fibrelor indică un tranzit accelerat.

Grăsimile au formă de globule ce se colorează în portocaliu cu Sudan III. Acizii grași sînt sub formă de cristale aciculare care nu se colorează cu Sudan III. Prezența grăsimilor în materiile fecale denotă o insuficiență pancreatică iar prezența de acizi grași, indică o deficiență biliară.

Amidonul apare colorat în galben cu Lugol atunci cînd este inclus în interiorul celulelor de feculă, colorat în albastru - negru, cînd este sub formă de granule de amidon rotunde sau ovale, stratificate în jurul unui nucleu periferic. În fine, se colorează în albastru cînd este sub formă de amidon amorf.

Prezența amidonului se datorește unei

digestii insuficiente datorită mai ales tranzitului rapid în hiperperistaltism sau se datorește unei insuficiențe pancreatice.

În cazul unei fermentații intestinale exagerate, în materiile fecale se găsește o floră iodo-filă ce se colorează cu soluția Lugol în violet din cauza amidonului pe care îl conține.

În caz de insuficiență clorhidrică apar celule cu oxalat de calciu care în mod normal sînt solvite de acidul clorhidric. De asemenea, se observă celule cu caroten după administrare de morcov. Tot în cazuri patologice apare mucusul ce se observă în flocoane hialine, înglobînd celule epiteliale, leucocite, hematii. În caz de stază și de putrefacție apar fosfații amoniaco-magnezieni.

DOZAREA ACIZILOR ORGANICI SI AMONIACULUI

(Metoda Goiffon - Nepveux)

Reactivi

1. Sol. clorură de aluminu 10 %
2. Hidroxid de calciu pulbere
3. Sol. fenolftaleină, indicator.
4. Sol. acid clorhidric 10 %
5. Sol. hidroxid de sodiu N/10
6. Sol. acid clorhidric N/10
7. Sol. formol neutralizat 20%
8. Sol orange IV (tropeolină 00):

Orange IV	2 g
Alcool 45 °	1000 ml

Prelucrarea materiilor fecale

Se omogenizează 10 g materii fecale cu 100 ml apă distilată. Se coagulează materiile fecale cu hidroxid de aluminiu. Pentru aceasta se adaugă în ordine 2 ml sol. clorură de aluminiu, 10 picături de fenolftaleină și amestecînd mereu cu pistilul mojarului se adaugă hidroxid de calciu pînă la culoarea roșie netă. Se lasă în repaus 10 minute și se filtrează.

I două pahare conice (unul pentru dozarea acizilor aminați și altul pentru dozarea amoniacului) se introduc cîte 25 ml filtrat. Se neutralizează conținutul celor două pahare cu acid clorhidric 10 % pînă la colorația slab roz.

Dozarea acizilor organici

Principiu

În filtratul pregătit ca mai sus se găsesc acizi organici în întregime în stare de săruri calcice. Prin adăugarea progresivă a unui acid mineral se eliberează acizii organici odată cu scăderea pH-ului. Liberarea completă a acizilor organici este la $\text{pH}=2,7$. Cunoșcînd cantitatea de acid utilizată pentru a ajunge la $\text{pH} = 2,7$ se cunoaște cantitatea de acizi organici.

Modul de lucru

Se pregătește mai întîi martorul care ne indică culoarea corespunzătoare $\text{pH} 2,7$. Pentru aceasta se măsoară într-un pahar conic, identic cu cel în care s-a introdus filtratul, 1,2 ml soluție acid clorhidric

N/10 și 0,5 ml soluție orange IV. Se completează cu apă distilată pînă la 60 ml.

În primul pahar conic cu filtrat neutralizat se adaugă 0,5 ml soluție orange IV. Se titrează cu acid clorhidric N/10 pînă la culoarea galbenă. Se completează cu apă distilată pînă la 60 ml. Se continuă titrarea pînă la o tentă identică cu a matorului. Se notează numărul de ml de acid clorhidric utilizați în total la titrare cu N.

Calcul

$(N - 1,2) \times 4 =$ cantitatea de acizi organici din 10 g materii fecale exprimată în ml de HCl N/10.

Valoarea 1,2 reprezintă excesul de acid clorhidric N/10 necesar pentru a aduce 60 ml apă distilată la $pH = 2,7$. Se înmulțește cu 4 deoarece 25 ml filtrat corespunde la a patra parte din materiile fecale.

Aciditatea se exprimă în mod obișnuit în ml de soluție HCl N/1 .

Valori normale

14 - 16 ml HCl N/1 pentru 100 g materii fecale.

Creșterea peste 20 ml HCl N/1 indică un proces de fermentație excesivă întâlnit în colite cu regim făinos. Scăderea sub 12 ml HCl N/1 indică o oprire a fermentațiilor normale de către putrefacțiile precoce cu caracter alcalin, sau în caz de evacuare prematură fără să fi avut loc procesul de fermentație.

Dozarea amoniacului

Principiu

Sărurile amoniacale, în mediu neutră, sînt tratate cu formol rezultînd hexametilentetramină (urotropină) cu eliberarea acidului respectiv. Acesta se va titra cu o soluție alcalină.

Modul de lucru

În al doilea pahar conic ce conține 25 ml filtrat neutralizat se adaugă cu pipeta 5 ml formol neutralizat. Prin aceasta colorația roz dispare ca urmare a punerii în libertate a acizilor. Acizii eliberați se titrează cu soluție de hidroxid de sodiu N/10 pînă la apariția culorii roz. Se notează numărul de ml de NaOH N/10 utilizați cu N.

Calcul

$$N \times 4 \times 10 = \text{ml sol NaOH N/10 sau}$$

$N \times 4 = \text{ml sol. NaOH N necesară pentru}$
titrarea a 100 g materii fecale.

Valori normale

3 ml soluție NaOH N pentru 100 g.

În practică se ține seama de valorile care depășesc 10 ml sau sînt sub 1 ml sol. NaOH N.

M E T O D E F I Z I C O - C H I M I C E D E A N A L I Z A

Datorită sensibilității limitate, duratei și izolării de multe ori dificile a componentului de analizat, se tinde spre înlocuirea metodelor clasice de determinare cu metode fizico-chimice de analiză.

Față de metodele chimice, metodele fizico-chimice de analiză se caracterizează în primul rând prin rapiditate, selectivitate și sensibilitate mărită, însă exactitatea lor relativă (pe scară macro) este inferioară metodelor chimice obișnuite.

Pe scară micro însă, metodele fizico-chimice se remarcă și printr-o exactitate mărită față de metodele chimice. În afară de aceasta, metodele fizico-chimice își găsesc aplicații largi și în stabilirea structurii substanțelor, a diferitelor constante, elucidarea unor mecanisme de reacție, etc. (De ex. rezonanța magnetică și de spin, efectul Mössbauer, spectroscopia de masă).

Aceste metode permit de asemenea realizarea unor dispozitive pentru indicarea continuă a concentrației unei substanțe dintr-un amestec, ceea ce permite automatizarea.

Metodele fizico-chimice de analiză se clasifică în:

- metode optice
- electrochimice
- radiochimice
- cromatografice.

METODELE OPTICE DE ANALIZA

Se bazează pe interacțiunea energiei radiante cu materia.

După proprietățile optice folosite, metodele se grupează în:

- metode de absorbție (colorimetrie, spectrofotometrie, turbidimetrie, nefelometrie)
- metode de emisie (spectrometrie, fotometria în flacără, fotoluminiscentă, spectrografia Raman)

Se mai aplică refractometria, interferometria și polarimetria.

Când un fascicul de raze de lumină I_0 cade pe o suprafață omogenă, o parte din energia lui se pierde prin reflexie I_r , alta pătrunde și se pierde prin absorbție I_a , iar ceea ce rămâne se transmite mai departe I_t .

$$I_0 = I_a + I_r + I_t$$

Deoarece I_r este constantă se poate neglija și atunci avem:

$$I_0 = I_a + I_t$$

$$I_t = I_0 - I_a$$

Dacă mediul este limpede, micșorarea intensității razei se datorește în primul rând absorbției energiei ei de către moleculele sau atomii substanței prin care trece și care absorb numai anumite porțiuni din spectru în UV (ultraviolet pînă la 400 nm) V (vizibil 400 - 700 nm) sau IR (infraroșu, peste 700 nm).

Cînd substanța absoarbe în vizibil, ea apare colorată cu culoarea complementară. Se numesc complementare perechile de culori care împreună produc lumina albă. De exemplu, o substanță care absoarbe roșul din spectrul vizibil apare colorată albastru - verzui.

Analiza chimică în care se determină concentrația unor soluții măsurînd absorbția radiațiilor se numește absorbțimetrie.

Cînd se măsoară absorbția în spectrul vizibil, metoda se numește colorimetrie, iar dacă se întrebuintează în loc de lumină albă numai o porțiune mică din spectru, lumină monocromă, metoda se numește spectrofotometrie.

Colorimetria cuprinde metodele optice în care se determină absorbția luminii de către substanța de analizat sau se compară culoarea unui strat din substanța respectivă cu culoarea unui etalon.

La baza analizelor colorimetrice stau legile lui Bouguer - Lambert și a lui A. Beer.

Absorbția luminii de către o substanță colorată este proporțională cu concentrația C a

substanței, grosimea de strat d și coeficientul de absorbție care depinde de natura substanței, ϵ (în cazul când concentrația este exprimată în moli/l și se numește coeficient molar de extincție).

Absorbția se mai numește și densitate optică (D) sau extincție (E).

Metodele colorimetrice cele mai utilizate sînt:

1. metoda seriilor etalon care constă în compararea intensității culorii soluției de analizat cu o serie de soluții etalon de concentrații cunoscute și crescînde, avînd aceeași grosime de strat cu soluția de analizat. Dispozitivul utilizat se numește comparator Walpole (vezi determinarea pH-ului urinar).

2. metoda titrării colorimetrice sau metoda diluării constă în compararea unui volum determinat al soluției necunoscute cu un volum egal de apă în care s-a adăugat o cantitate cunoscută de etalon pînă la egalarea intensităților.

3. metoda egalării constă în egalarea intensității culorii soluției de analizat cu a soluției etalon prin variația înălțimii stratului absorbant. Aparatele cele mai utilizate sînt: colorimetrul Wolf și colorimetrul de imersie Duboscq.

Determinări mai exacte se efectuează utilizînd filtre colorate care lasă să treacă numai o anumită bandă de lungimi de undă.

Filtrele pot fi de absorbție și de interferență.

Filtrele de absorbție rețin radiațiile nedorite prin absorbție și se confecționează de obicei din sticlă, gelatină sau soluții colorate. Se caracterizează prin lățimea benzii transmise.

Filtrele de interferență transmit o bandă spectrală mult mai îngustă putând fi utilizate în domeniul ultraviolet, vizibil sau infraroșu.

Filtrele sînt notate de exemplu S_{43} , S_{47} , S_{53} etc., cifra indicînd porțiunea de lumină care este lăsată să treacă și lungimea ei de undă (S_{53} lasă să treacă razele din banda de 530 Å. Ele au o aproximație de 10 - 12 Å, de aceea nu este indicată a treia cifră.).

Filtrele care lasă să treacă o cantitate mai mare de lumină se notează cu L. Acestea se utilizează în cazul substanțelor care absorb puternic lumina (în cazuri speciale colorația urinei) și în nefelometrie.

Culorile din spectrul vizibil

Lungimea de undă în nm	Culoarea	Culoarea complementară
400 - 450	Violet	Galben-verde
450 - 480	Albastru	Galben
480 - 490	Verde-albastru	Portocaliu
490 - 500	Albastru-verde	Roșu
500 - 560	Verde	Roșu-purpur
560 - 570	Galben-verde	Violet
570 - 590	Galben	Albastru
590 - 625	Portocaliu	Verde-albastru
625 - 750	Roșu	Albastru-verde

Aparatele utilizate sînt fotometrul Pulfrich și IOR.

Fotocolorimetria se bazează pe transformarea fluxului luminos în energie electrică prin intermediul celulelor fotoelectrice care înlocuiesc ochiul. Aparatul care funcționează pe baza acestui principiu este FEK.

Spectrofotometria utilizează un monocromator capabil să selecteze fasciculul de raze monocromatice. Fasciculul de raze selectat este de cca 1 mm (de la 180 - 2000 nm) incluzînd domeniile ultraviolet, vizibil, infraroșu.

În general, aparatele folosite au următoarele părți componente:

1. Sursa de radiații (bec cu filament de wolfram, lămpi spectrale),

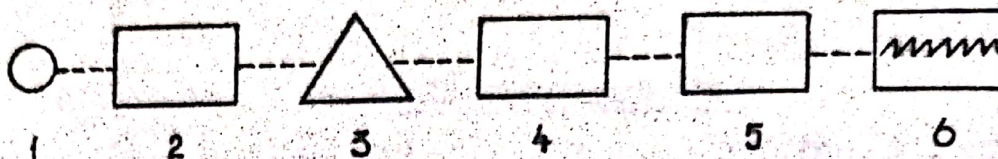
2. Dispozitive de reglare a fasciculului de radiații (diafragmă, fantă cu deschidere variabilă, etc.),

3. Dispozitiv de reglare a lungimii de undă - selectori de bandă - (filtre, monocromatoare cu prismă sau rețea de difracție),

4. Suport pentru probe (cuve),

5. Receptori de radiație (fotoelement, ochiul),

6. Indicator sau înregistrator (galvanometru, mecanism de înregistrare, potențiometru, osciloscop).



Schema bloc a unui aparat pentru determinarea extincției soluțiilor.

Determinarea concentrației substanței de analizat se face fie folosind o soluție etalon, fie raportînd la o curbă etalon.

Metoda curbei de etalonare

Cînd folosim pentru prima dată o metodă se recomandă să se execute o curbă cu o gamă de soluții etalon de concentrații cunoscute din substanța cercetată și reactivii ce iau parte la reacție.

Este indicat să se refacă curba ori de cîte ori un reactiv este schimbat.

Pentru stabilirea curbei etalon se iau în lucru cantități de substanță care să se încadreze sub și deasupra valorii normale întîlnite în mediul biologic studiat. Pentru obținerea acestora se pleacă, de obicei, de la o soluție etalon, care se diluează convenabil. Este obligatoriu să se facă pentru fiecare probă etalon mai multe determinări, stabilindu-se în final media aritmetică a extincțiilor care se vor înscrie pe curbă.

Pe abscisă se trec cantitățile în mg a

substanței luate în probă iar pe ordonată, extincțiile găsite. Volumul final, la care se diluiază soluția colorată a etaloanelor, trebuie să fie același și la probe.

Exemplu de trasare a curbei etalon pentru dozarea fosforului anorganic:

	1	2	3	4	5	6
Concentrația în mg (P) din probă	0,010	0,025	0,050	0,075	0,1	0,125
Extincția obținută	0,061	0,155	0,310	0,456	0,6	0,757

Calcul

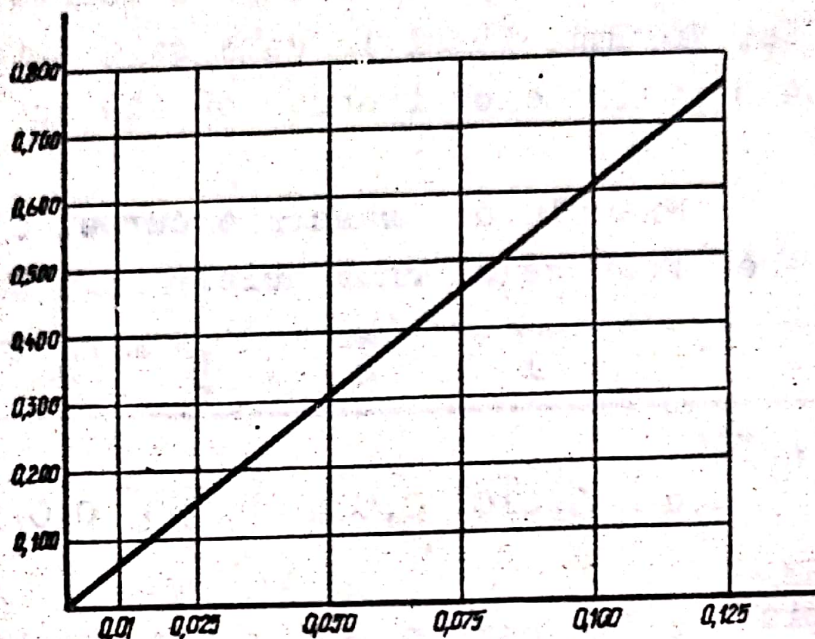
Extincția obținută pentru probă se raportează la curba etalon și se obține concentrația în mg a substanței cercetate.

La calcul se va ține seama totdeauna de volumul de lichid biologic luat în analiză.

În cazul în care reacția de culoare este proporțională cu concentrația pe o zonă largă, curba este liniară și trece prin origine, vezi graficul alăturat.

În acest caz calculul se poate simplifica înmulțind extincția cu factorul de pantă.

Factorul de pantă se calculează astfel: se împarte concentrația substanței în mg din probă



Curba etalon pentru dozarea P anorganic.

etalon la valoarea extincției pentru fiecare punct de pe curbă.

Cifrele găsite trebuie să fie foarte apropiate. Se face totalul acestor valori și se împarte la numărul probelor. Valoarea obținută se înmulțește cu extincția probei.

Valoarea finală se raportează la volumul de lichid biologic la care vrem să exprimăm rezultatul.

Dacă reacția de culoare nu este proporțională cu concentrația, curba nu are caracter linear și nu trece prin origine. În acest caz este obligatoriu să se citească valoarea în mg a probei numai

pe curba etalon, fără a mai folosi factorul de pantă.

Stabilirea factorului de pantă:

	Concentrația în mg P din probă	E	mg P/E	Factorul de pantă (F)
1	0,010	0,061	0,010/0,061	0,160
2	0,025	0,155	0,025/0,155	0,161
3	0,050	0,310	0,050/0,310	0,161
4	0,075	0,456	0,075/0,456	0,163
5	0,100	0,602	0,100/0,602	0,166
6	0,125	0,757	0,125/0,757	0,165

Media pentru F a probelor etalon 0,163

Metoda soluției etalon

În anumite situații se poate folosi o singură soluție etalon, care se tratează la fel cu proba. Se citesc extincțiile etalonului și probei față de martor (apă distilată sau reactivii folosiți, în afara substanței care generează culoarea) și se calculează concentrația substanței cercetate astfel:

$$E_{et} \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot C_{et}$$

$$E_P \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot C_P$$

$$C_P = \frac{E_P}{E_{et}} \times C_{et} = \text{mg substanță de}$$

analizat în volumul de lichid biologic luat în analiză.

E_{et} = extincția etalonului

E_p = " probei

C_{et} = concentrația soluției etalon

C_p = " probei

Observații

Pentru ca o metodă colorimetrică să fie utilizată cu succes, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

1. Culoarea să fie specifică substanței cercetate iar din soluția etalon îndepărtate, pe cât posibil, substanțele care dau o culoare asemănătoare sau care pot micșora intensitatea culorii.

2. Culoarea să fie stabilă toată perioada de citire a extincțiilor. Se va stabili perioada în care culoarea are o intensitate maximă și o stabilitate maximă.

3. Culoarea nu trebuie să varieze în funcție de mediu (pH). Dacă avem variații ale culorii cu pH-ul se va standardiza valoarea pH-ului optim pentru maximum de culoare.

4. Culoarea să fie stabilă cu temperatura. În cazul unor variații este indicat să se facă citirea la o anumită temperatură.

5. Intensitatea culorii să fie proporțională cu concentrația (să respecte legea Lambert-Beer). În cazul extincțiilor mai mari de 0,500 se diluiază produsul de analizat convenabil pentru a obține in-

tensități de culoare care să se încadreze în limitele legii colorimetriei.

6. Este obligatoriu ca, ori de câte ori se trasează o curbă etalon, să se utilizeze fotocolorimetrul laboratorului și să nu se ia drept bune curbele obținute cu un alt aparat. Pentru a evita erori la citire (funcție de ochi) este recomandabil ca fiecare om de laborator, care folosește fotocolorimetrul, să-și traseze personal curba etalon.

Flamfotometria

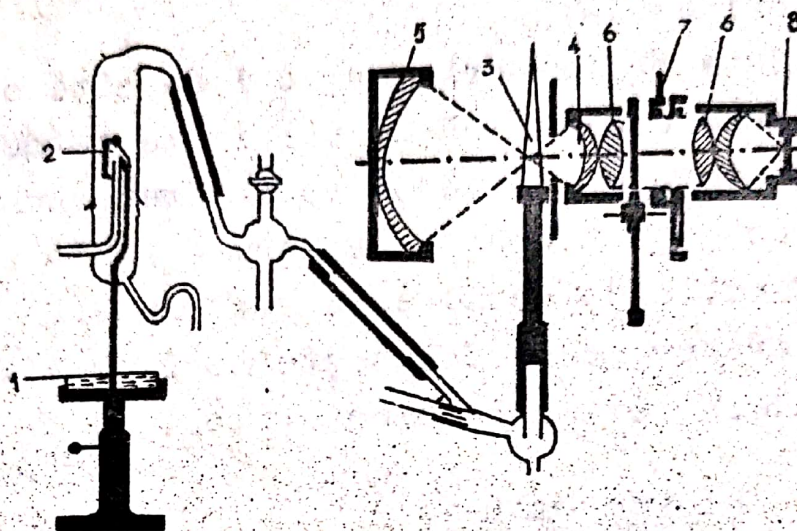
Este o metodă de analiză cantitativă, care permite determinarea concentrației metalelor alcaline și alcalino-terose dintr-o soluție.

Principiul metodei se bazează pe faptul că intensitatea radiațiilor unui spectru de flacără este în funcție de numărul atomilor excitați și deci de cantitatea elementului respectiv.

Serul diluat cu apă distilată este fin pulverizat cu ajutorul unui pulverizator de sticlă alimentat cu aer comprimat și condus într-un arzător unde are loc excitarea ionilor.

Radiațiile emise sînt selectate cu un filtru de interferență corespunzător elementului căutat și cad apoi pe o celulă fotoelectrică.

Curentul fotoelectric este proporțional cu concentrația elementului respectiv din probă și este măsurat cu un galvanometru.



Schema flamfotometrului:

1- soluția de cercetat; 2 - pulverizatorul; 3 - flacăra; 4,5,6,7 - sistemul optic; 8 - receptorul.

Reactivi

1. Sol. NaCl 5,845 g ‰

2. Sol. NaCl 16,4 g ‰

3. Sol. KCl 0,7456 g ‰

4. Sol. CaCl_2 2,75 g ‰

CaCO_3 0,2492 g

HCl N 5 ml

Apă dist. pînă la 100 ml

5. Sol. LiCl 0,424 g ‰

LiCO_3 0,073 g

HCl N 2 ml

Apă dist. pînă la 100 ml

Curba etalon pentru sodiu

mEq/l	Sol. NaCl 5,845 g % ml	Apă distilată ml
160	16	pînă la 1000
140	14	"
120	12	"
100	10	"

Pentru dozarea Na, serul se diluiază 1/100

Curba etalon pentru potasiu

mEq/l	Sol. KCl 0,7456 % ml	Sol. NaCl 16,4 % ml	Apă distilată ml
8	16	10	pînă la 1000
6	12	10	"
4	8	10	"
2	4	10	"

Pentru dozarea K, serul se diluiază 1/50

Curba etalon pentru calciu

mEq/l	Sol. CaCl ₂ 2,75 % ml	Sol. NaCl 16,4 % ml	Sol. KCl 0,7456 % ml	Apă dist. ml
2	4	50	50	la 1000
4	8	50	50	"
5	10	50	50	"
6	12	50	50	"

Pentru dozarea Ca, serul se diluiază 1/10

Curba etalon pentru litiu

mEq/l	CaCl ₂ 2 ‰ ml	NaCl 16,4 ‰ ml	KCl 0,7456‰ ml	LiCl 0,424‰ ml	Apă dist. ml
0	10	50	50	-	la 1000
1	10	50	50	5	"
2	10	50	50	10	"
3	10	50	50	15	"
4	10	50	50	20	"

Pentru dozarea litiului, serul se diluiază 1/10.

Modul de lucru

Analiza flamfotometrică cuprinde trei etape importante:

- etalonarea imaginii flăcării prin stabilirea punctului de inversiune al acetilenei,
- stabilirea curbei etalon,
- determinarea propriu zisă.

Pentru a obține rezultate corecte este necesar să se mențină constante condițiile de funcționare ale aparatului și flăcării, concentrația soluției fiind singura variabilă.

Având toate indicatoarele în poziția zero și filtrul corespunzător elementului cercetat, se deschide progresiv robinetul buteliei de aer comprimat, pentru realizarea presiunii cuprinsă între 0,20-0,30 atmosfere, se deschide apoi progresiv robinetul buteliei de acetilenă și se reglează presiunea pînă la

o diferență de nivel de 30- 40 mm coloană de apă.

După realizarea raportului favorabil de presiune între acetilenă și aer comprimat, se aprinde amestecul și se pulverizează apă distilată timp de 20 minute pentru spălarea aparatului.

Etalonarea imaginii flăcării prin stabilirea punctuului de inversiune al acetilenei se face prin pulverizarea unei soluții de concentrație medie. Se deschide galvanometrul și apoi diafragma. Deschiderea diafragmei nu trebuie să depășească $2/3 - 3/4$ din diametrul total. Se citește extincția pe una din scările aparatului prin variația raportului de presiune dintre acetilenă și aer. Punctul maxim al valorilor citite (după care aceste valori încep să scadă) reprezintă punctul de inversiune al acetilenei. Presiunea corespunzătoare reprezintă presiunea optimă de lucru.

Pentru stabilirea curbei etalon se pulverizează soluția etalon de concentrație normală, se deschide galvanometrul și se citește extincția.

Se procedează identic și cu celelalte soluții etalon, de la concentrația cea mai mică pînă la concentrația cea mai mare, avînd grijă ca după fiecare determinare să se spele aparatul.

Cu extincțiile obținute se trasează curba etalon a cărei alătură depinde de caracteristicile substanței studiate.

Punerea aparatului în funcție pentru o nouă determinare necesită o operație de etalonare numai cu soluția de concentrație normală, pentru a

stabili deschiderea de fantă care să asigure o extincție egală cu cea precedentă.

Datorită impurităților din acetilenă este necesar ca după câteva determinări, după stabilirea deschiderii de fantă și citirea soluției etalon de concentrație normală, să se revizuiască întreaga curbă etalon. Intre determinări se închide galvanometrul.

Calcul

Funcție de extincția căpătată, se citește concentrația elementului cercetat direct pe curbă.

ELECTROFOREZA

Electroforeza este fenomenul de migrare a particulelor încărcate electric, dintr-o soluție coloidală, spre poli, la trecerea unui curent electric.

Trebuie să se realizeze condiții de mediu cu pH și forță ionică (μ) cunoscută, menținându-se o vâscozitate constantă în tot timpul efectuării electroforezei.

Electroforeza pe hîrtie

Metoda constă în aplicarea soluției de analizat sub formă de picături sau dungă pe o hîrtie de filtru îmbibată cu o soluție tampon și așezată apoi într-un câmp electric. Sub tensiunea curentului electric aplicat la capetele benzii de hîrtie, fracțiunile componente se desfac și sînt puse în eviden-

ță cu ajutorul coloranților. Spoturile colorate pot fi evaluate prin fotometrare directă sau prin eluare și apoi fotocolorimetrare.

Reactivi

1. Sol. tampon:

Se folosesc diferite soluții tampon specifice fracțiunilor de separat. Majoritatea lor au la bază acidul dietil barbituric (veronal) sau sarea de sodiu a acestuia.

Soluțiile tampon folosite pentru electroforeză mențin pH-ul în limite fixe de 8,5 - 8,6, pH la care toate proteinele sînt anioni și diferența de mobilitate este cea mai potrivită pentru fracționare, împiedecînd variația pH-ului prin disocierea în afara limitelor tamponului.

2. Coloranți:

Aceștia sînt specifici pentru fracțiunile proteice, lipoproteice și glicoproteice, fiind preparați în mod adecvat.

Hîrtia de filtru

Se întrebuintează o hîrtie de filtru specială, asemănătoare aceleia folosită în cromatografie. Cele mai utilizate tipuri de hîrtie sînt:

- hîrtia Whatmann 1; 4 sau 100
- hîrtia Munktell (Suedia) 20
- hîrtia Schleicher-Schul 2024, 2043.

Benzile de hîrtie folosite pot fi de 2, 3, 4 sau 6 cm lățime și de 20, 30 sau 40 cm lungime, în raport cu dimensiunea camerei și cu tehnica utili-

zată.

Hîrtia trebuie să prezinte o adsorbție minimă și egală pentru diferitele fracțiuni, o structură omogenă și aceeași grosime pe toată suprafața.

La folosirea ei trebuie evitată o atingere frecventă, deoarece grăsimea de pe mâini poate produce o inegalitate în adsorbție și în migrarea lichidului de cercetat, cât și o colorație inegală.

Aparatul de electroforeză este compus din:

- redresor,
- cameră umedă sau cuvă
- electrozi

Tehnica electroforezei pe hîrtie

Pregătirea cuvelor și a benzilor de hîrtie.

Cele două vase din camera umedă sînt umplute cu soluția tampon și aduse la același nivel. La o distanță de 8 cm de la capătul benzii se trage o linie transversală și se umectează banda cu tampon, se scurge bine și se așează în cuvă unde este fixată prin adeziune.

Reglarea curentului. Capetele benzilor sînt introduse cel puțin 1 cm în soluția tampon din cele două vase. Se acoperă etanș camera și se dă drumul la curentul electric timp de 1/2 ore, apoi se oprește și se aplică lichidul de cercetat. Curentul este reglat la 0,2 mA /cm de hîrtie (lățime). Tensiunea în volți se reglează în raport cu lungimea benzii, iar intensitatea în mA/ lățime. Curentul electric utilizat variază între 80 - 400 V, ceea ce

corespunde la 4 - 20 mA.

Aplicarea lichidului de cercetat. Se aplică lichidul de cercetat pe linia trasată la 8 cm de la capătul benzii aflate la catod (-). Aplicarea lichidului se face la catod cu o micropipetă și cât mai uniform repartizat. Cantitatea de lichid variază de la 0,005 - 0,03 ml în funcție de proba de determinat.

Durata migrării. După repartizarea lichidului, după întinderea perfectă a benzilor de hîrtie și după reglarea curentului, se acoperă perfect cuva și se lasă timpul necesar fixat pentru migrare. În mod obișnuit acesta este de 2, 3, 6 și 12 ore, folosind un curent de 0,2 - 0,4 mA/cm.

Uscarea benzilor. Acestea se scot după timpul necesar din camera umedă și se expun jumătate de oră la temperatura camerei. Se țin apoi la etuvă timp de 30 minute la 100°C pentru fixarea proteinelor.

Colorarea și spălarea. Electroforegrama fixată prin căldură se introduce apoi în baia colorantă, apoi pentru îndepărtarea excesului de colorant se spală cu o soluție de CH_3COOH 2 %.

Uscarea electroforegramei. Se face timp de 10 - 20 minute prin așezarea ei între două hîrtii de filtru pentru îndepărtarea excesului de lichid.

Evaluarea electroforegramei. Se efectuează utilizînd procedeul eluției. Acesta constă în decuparea spoturilor colorate, eluția lor și colorimetrarea sau fotocolorimetrarea eluatului.

Eluarea spoturilor se face în soluții

alcaline. Spoturile separate sînt tăiate mărunt (2 mm) și se introduc în eprubete numerotate. Fiecare fracțiune se eluiază în 3 ml din amestecul următor: Na_2CO_3 4 % în metanol 50 % timp de o oră pentru a se extrage complexul colorat de pe hîrtie. Probele eluate se citesc la fotometrul Pulfrich în cuva de 1 cm, filtrul S_{60} , față de martor. Martorul este o parte din hîrtia pe care s-a făcut electroforeza și pe care în urma dezvoltării nu s-au obținut spoturi. Acest martor permite corectarea eventualelor cantități de revelator insuficient spălate.

Citirea se face pe scara de extincție pentru fiecare fracțiune proteică, iar suma extincțiilor se egalează cu 100. Se calculează apoi cît reprezintă în procente fiecare fracțiune a lichidului analizat.

Calcul

$$\frac{E_{\text{fracțiune}} \times 100}{\sum E} = \text{conținutul procentual, relativ al fracțiunii.}$$

DOZAREA ELECTROFORETICA A PROTEINELOR DIN SERUL SANGUIN. - PROTEINOGRAMA -

Reactivi

1. Sol. tampon veronal, pH 8,6
forța ionică 0,05:
acid dietilbarbituric

1,84 g

- | | |
|--|---------|
| dietilbarbiturat de sodiu | 10,33 g |
| apă distilată pînă la | 1000 ml |
| forța ionică 0,075: | |
| acid dietilbarbituric | 2,76 g |
| dietilbarbiturat de sodiu | 15,40 g |
| apă distilată pînă la | 1000 ml |
| 2. Sol. de colorare | |
| albastru de bromfenol | 0,1 g |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 50 g |
| acid acetic glacial | 50 ml |
| apă distilată pînă la | 1000 ml |
| 3. Acid acetic 2 % | |
| 4. Sol. Na_2CO_3 4 % în metanol 50 % | |
| 5. Sol. acetat de sodiu 2 % în CH_3COOH 10 % | |

Modul de lucru

Benzile de hîrtie sînt aranjate în cuva aparatului după ce în prealabil au fost umectate în soluție tampon veronal, forță ionică 0,05. Se fixează tensiunea necesară (0,1 - 1,5 mA pentru fiecare cm lățime a benzii) și se lasă aparatul în funcțiune 30 minute. Se depune apoi 0,005 - 0,01 ml ser sanguin clar și nehemolizat. Se ține în camera de electroforeză 3 - 12 ore; apoi se usucă și se colorează cu albastru de bromfenol 1‰.

Excesul de colorant se înlătură trecînd proteinograma în trei băi de CH_3COOH 2 %, cîte 5 minute în fiecare baie. În final benzile se introduc timp de 2 minute într-o soluție de CH_3COONa 2 %.

După dezvoltare, pe benzile de hîrtie

cromatografică apar cel puțin 4 spoturi colorate, care corespund albuminelor, α , β , și γ -globulinelor. La pH 8,6 aceste proteine migrează în direcția anodului, deoarece în condițiile experimentale redată ele posedă sarcini electronegative. Viteza de migrare fiind diferită, fracțiunile se repartizează în următoarea ordine: albumine, α -globuline, β -globuline, γ -globuline.

Pentru determinarea cantității de proteină din fiecare fracțiune izolată electroforetic, se utilizează metoda eluției.

Valori normale

albumină	62 %
α_1 - globulină	3,8 %
α_2 - globulină	7 %
β - globulină	9,2 %
γ - globulină	18 %

Interpretare

Prin dozarea proteinelor totale se obțin date asupra stărilor de hipoproteinemie sau hiperproteinemie, des întâlnite în diferite stări patologice. Hipoproteinemii apar în: sindromul nefrotic, comotii cerebrale, encefalite, boli hepatice, stări de șoc, inanție, pancreatite, boala Addison, avitaminozele B, boli cronice febrile. Hiperproteinemii apar în: boala Kahler în care concentrația proteinelor plasmatiche poate depăși valori de 10 g %, hepatite virotice, anemie pernicioasă.

Proteinemia poate prezenta variații fiziologice într-o serie de situații ca de exemplu vîrsta.

DOZAREA ELECTROFORETICA A LIPOPROTEINELOR
DIN SERUL SANGUIN. - LIPIDOGRAMA -

Reactivi

1. Sol. tampon este aceeași ca și pentru dozarea proteinelor.

1. Sol. de colorare

Sudan negru B	0,1 g
alcool de 60°	100 ml

După ce colorantul a fost adus în suspensie prin agitare puternică, se fierbe o oră în balon cu refrigerent. Se răcește și se filtrează prin hîrtie Whatman 1, se completează cu alcool de 60° la 100 ml și se păstrează la întuneric.

Modul de lucru

Lipidele se găsesc în serul sanguin în proporție de 0,6 - 0,7 g %, deci o valoare de zece ori mai scăzută decît față de proteine. De aceea se aplică o cantitate de ser de 7 - 10 ori mai mare decît pentru proteinogramă. Condițiile de lucru pentru separarea fracțiunilor lipoproteice sînt identice cu cele pentru separarea proteinelor.

Timpul de colorare a lipidogramelor variază după colorant. Pentru Sudan negru B acest timp este de 3 ore, iar îndepărtarea excesului de colorant se face timp de 15 minute cu alcool de 60° în trei băi diferite. Se usucă identic cu proteinograma.

Eluarea benzilor se face prin diluție tăind banda în fîșii mici și extrăgînd culoarea cu amestec de alcool etilic și CH_3COOH 20 % în părți egale.

Se citește densitatea optică la filtrul S_{590} față de un martor.

Valori normale

Se pot extrage între 4 și 6 fracțiuni lipoproteice, două fiind principale. Prima, situată între albumine și α -globuline, conține 10 - 25 % din colesterolul seric și fosforul lipidic. Al doilea spot are vârful situat între β și γ -globuline.

α - lipoproteine	28,5 %
β - lipoproteine	56 - 58 %

Interpretare

Modificarea cantitativă a fracțiunii

β - globulinice este legată de boli în care este vorba în majoritate de modificări ale metabolismului lipidic. Scăderea fracțiunii β - globulinice este citată în unele boli nervoase și la indivizi care au suportat iradieri.

DOZAREA ELECTROFORETICA A GLICOPROTEINELOR DIN SERUL SANGVIN. - GLICOGRAMA -

Reactivi

1. Sol. oxidantă

acid periodic	7,2 g
$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	2,5 g

Se dizolvă întâi în 270 ml apă apoi se adaugă 600 ml alcool absolut.

2. Sol. tiosulfat - iodură

tiosulfat de sodiu	15 g
--------------------	------

iodură de potasiu	15 g
apă distilată	300 ml

3. Reactiv Schiff

1,5 g fuxină acidă se dizolvă în 500 ml apă distilată fierbinte și apoi se filtrează la 55°C. Soluției răcite la 40°C i se adaugă 25 ml HCl 2N și 3,75 g metabisulfat de sodiu; se agită pentru dizolvare rapidă. Se completează cu apă la 500 ml. Se păstrează apoi 16 ore la gheață, se adaugă 2,5 g cărbune activ și se lasă în contact 10 minute. Se filtrează repede.

4. Sol. metabisulfat

În 100 ml apă se dizolvă 6,85 g metabisulfat de sodiu sau 8 g metabisulfat de potasiu. Se adaugă 10 ml HCl conc.

5. Sol. tiosulfat - iodură - alcool - HCl

Se amestecă 300 ml din soluția tiosulfat-iodură cu 450 ml alcool absolut. Se adaugă încet 7,5 ml HCl 2N.

6. Alcool de 70 %

7. Hidroxid de sodiu 1 N

Modul de lucru

Condițiile de lucru sînt ca și cele pentru separarea proteinelor, adăugîndu-se însă de 2 - 3 ori mai mult ser deoarece glicoproteinele sînt în cantități mai mici decît proteinele.

După migrare, electroforegrama este uscată la temperatura camerei și apoi la 110°C timp de 10-20 minute. Banda uscată este trecută prin alcool timp de 10 minute și apoi lăsată 8 minute în soluția

oxidantă. Se spală timp de 2 minute cu alcool de 70 % și apoi se trece pentru 7 - 8 minute în soluția reductoare 5. Se spală rapid în alcool 70 % pentru îndepărtarea urmelor de acid periodic și se usucă apoi între două hîrtii de filtru pentru îndepărtarea lichidului în exces. Se trece în soluție de fuxină bazică pentru 25 - 40 minute, timp în care se dezvoltă maximum de culoare. Se spală de 5 ori cîte 3 minute cu metabisulfit, se tratează 2 secunde cu alcool și se usucă la temperatura camerei la întuneric.

Evaluarea fracțiunilor obținute se face prin procedeul eluției. Hîrtia se taie în fîșii mici și se trece în eprubetele de centrifugă, care conțin cîte 5 ml NaOH N. Se acoperă eprubetele și se lasă la 70°C timp de 2 ore; se adaugă în fiecare cîte 5 ml alcool absolut, se răcesc și se mai adaugă 1 ml acid acetic glacial. Lichidul se centrifughează.

Se citește densitatea optică cu filtrul S₅₅₀ față de eluatul obținut din fondul electroforegramei.

Calcul.

Se scade extincția martorului, se face suma extincțiilor și se calculează compoziția procentuală a fracțiunilor respective.

Valori normale

În serul normal fracțiunile glicoproteice sînt în număr de 5 și se găsesc în concentrație mare între α_1 și α_2 -globuline - complex glico - lipido - proteic, iar între β și γ - globuline concentrațiile

sînt mici.

albumine	75 %
α_1 -globuline	12 %
α_2 -globuline	29,5 %
β -globuline	21,8 %
γ -globuline	15 - 16 %

ELECTROFOREZA ÎN GEL

Ca mediu poros în care migrează particulele proteice se pot folosi: silicagelul, gelurile de agar, amidon, poliacrilamidă (PAA), agaroză, sefaroză, fosfat de calciu.

Această metodă se aplică la fracționarea acizilor nucleici (AN) și la evidențierea activității enzimelor.

Aceste geluri au avantajul de a avea o anumită porozitate. Prin electroforeza în aceste geluri, AN atît ADN cît și ARN care prezintă în general rapoarte relativ constante (încărcare electrică, mărime moleculară) sînt fracționate pe baza efectului de "cernere sau filtrare moleculară". Dintr-un amestec de AN supus electroforezei în gel, diferite specii moleculare de ADN sau ARN se vor separa una de alta în funcție de mărimea lor moleculară, mobilitatea lor electroforetică depinzînd de diametrul efectiv al moleculelor.

Electroforeza în gel se aplică în domă

variante tehnice: pe placă și pe coloană.

ELECTROFOREZA ACIZILOR NUCLEICI PE PLACI DE GEL

Indiferent de gelul folosit pentru efectuarea electroforezei, se disting următoarele etape:

- a. pregătirea materialului ce urmează a fi supus electroforezei;
- b. alegerea tamponului pentru electroforeză;
- c. prepararea gelului;
- d. efectuarea electroforezei;
- e. evidențierea fracțiunilor electroforetice.

a. Pregătirea materialului

Acizii nucleici sînt diluați cu apă sau cu tamponul folosit pentru prepararea gelului. Se recomandă ca aceștia să nu fie totuși prea diluați, deoarece uneori este necesar ca ei să fie diluați cu un adaos de agaroză în vederea pipetării lor în gel (10 - 100 μ g AN/probă, respectiv 250 - 2500 μ g AN/ml).

b. Alegerea tamponului

Cele mai utilizateampoane sînt:

1. Tris - acid citric (pH = 7,9)
2. Tris - Na_2EDTA - acid boric (pH = 8,3)
3. Tris - NaH_2PO_4 - Na_2EDTA (pH = 7,6 - 7,8)

Dintre tampoanele menționate, primul se recomandă pentru gelul de agaroză și celelalte două pentru gelurile de PAA.

c. Prepararea gelurilor

1. Gelul de poliacrilamidă

Se prepară o soluție de acrilamidă 15 % (acrilamidă 95 % și bis-acrilamidă 5 %). Soluția se păstrează la rece și întuneric.

Pentru a obține gelurile de concentrație dorită se prepară amestecurile de monomeri, tampon și catalizator (TEMED) conform tabelului de mai jos. Cifrele din tabel se referă la un volum de 55 ml, volum necesar pentru a obține o placă de gel cu dimensiunile 150x110x3 mm.

Gelul conține: (ml)	Concentrația gelului				
	2 %	2,5 %	3 %	3,5 %	4 %
Tampon	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50
AA - bis-AA 15%	7,40	9,20	11,00	13,00	14,80
Apă distilată	41,70	40,00	38,50	36,80	34,00
TEMED	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70

2. Gelul de agaroză

Agaroza este unul din componentele agarului. Se obține din agar prin îndepărtarea fracțiunii carboxilate și sulfatate denumită agarpectină.

Gelul de agaroză (1,5 - 2 %) se prepară în tampon Tris 0,02 M - acid citric (pH = 7,9;

tampomul pentru electroforeză diluat 1 : 10) prin încălzire în baie de apă la fierbere. După răcire la circa 50°C, gelul se toarnă pe placă.

d. Efectuarea electroforezei

Dispozitivul pentru turnarea plăcilor de PAA și agaroză constă din cutii paralelipipedice de anumite dimensiuni în care se toarnă gelurile. Legătura gelului cu tamponul din cuve se realizează cu hîrtii de filtru.

Electroforeza în PAA se realizează în tampon Tris - EDTA - acid boric diluat, folosindu-se 150 V și circa 1 - 1,2 mA/cm² timp de 3 - 4 ore, în funcție de concentrația gelului, iar pentru agaroză se aplică 175 V și 0,73 mA/cm² timp de 120 minute.

e. Evidențierea fracțiunilor electroforetice

După efectuarea electroforezei, diferitele specii moleculare fracționate sînt evidențiate fie direct, prin stabilirea absorbției în ultraviolet, fie prin colorare cu diferiți coloranți. Obișnuit se utilizează albastru de toluidină 0,01 % (pentru agaroză) și 0,2 % în tampon acid acetic - acetat 0,4 M (pentru PAA).

După colorarea fracțiunilor gelurile pot fi uscate și păstrate. Uscarea se efectuează la temperatura camerei sau într-un cîurent de aer cald.

Dacă se urmărește eluția fracțiunilor de AN obținute electroforetic, gelurile sînt secționate transversal pe lungimea lor în fîșii de 0,1-1,0 mm. Bucățile astfel obținute sînt omogenizate și

extrase cu NaCl 0,25 M; se centrifughează iar AN din supernatant sînt precipitați cu etanol.

ELECTROFOREZA ACIZILOR NUCLEICI PE COLOANA DE GEL

Tehnica electroforezei pe coloană este asemănătoare celei pe placă, deosebirea constînd în faptul că proba va migra nu pe o placă ci pe o coloană de gel. Etapele parcurse în efectuarea electroforezei sînt aceleași.

a. Pregătirea materialului

Concentrația acizilor nucleici în probă trebuie să fie aproximativ de 1 mg/ml. Proba se amestecă cu o picătură de albastru de bromfenol (soluție alcoolică 0,1 %) și cu zaharoză pînă capătă o consistență mai mare pentru a fi mai densă decît tampo-
mul din cuve..

b. Tamponul

Tris 0,04 M	4,84 g
CH ₃ COONa.3H ₂ O 0,02 M	2,72 g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,372 g

Se completează la 1000 ml cu apă distilată și se aduce la pH 7,3 cu CH₃COOH glacial (aproximativ 2 ml).

Acest tampon se prepară dintr-o soluție de 10 ori mai concentrată și se diluiază în momentul întrebuintării.

c. Prepararea gelului

Soluție A:

HCl 1 N	48 ml
Tris	36,6 g
TEMED	0,23 ml

Se completează la 100 ml cu apă.

Soluție B:

Acrilamidă	28 g
NN'-metilen-bis-acrilamidă	0,735 g

Se completează la 100 ml cu apă.

Soluție C:

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0,14 g în 100 ml apă.

În momentul preparării coloanelor de gel, soluțiile de mai sus se amestecă în următoarele proporții: 1 parte soluție A : 2 părți soluție B : 3 părți soluție C : o parte apă.

d. Efectuarea electroforezei

Dispozitivul folosit constă dintr-o serie de tuburi (6-12) cu diametrul interior de 6 - 8 mm și lungimea de 10 cm. Acestea sînt montate pe verticală într-un rezervor. Partea superioară a lor rămîne în cuva de sus, iar cea inferioară este cuprinsă în rezervorul de jos. Rezervoarele (cuvele) sînt construite din plexiglas. Curentul electric circulă de la catod din rezervorul superior prin tuburile cu gel spre electrodul pozitiv din rezervorul inferior.

Tuburile spălate și uscate sînt închise la partea inferioară cu o membrană de cauciuc

menținute cu un inel elastic. În tuburi se introduce pînă la un anumit nivel amestec din soluțiile A,B,C. Peste acest amestec se pipetează cu grijă 0,1 - 0,2 ml apă pentru obținerea unei suprafețe plane la extremitatea superioară a coloanei de gel și totodată pentru a facilita gelifierea. (polimerizarea are loc mai repede în absența aerului). Se mențin astfel 30 - 45 minute. După ce li s-au scos membranele de cauciuc, tuburile se introduc în lăcașurile rezervorului superior. Se introduce tamponul în vasele de electroforeză; în vasul inferior tamponul trebuie să depășească cu 1 - 2 cm extremitatea inferioară a tuburilor. Se îndepărtează bulele de gaz eventual formate la interfața tampon - gel cu ajutorul unei pipete la care se adaptează o pară.

Proba (0,1 - 0,2 ml) este introdusă cu ajutorul unei micropipete la aproximativ 1 - 2 mm distanță de gel.

Se plasează electrozii: cel negativ în vasul superior, iar cel pozitiv în vasul inferior. Se aplică un curent de 2 mA, 100 V în primele 30 de minute iar apoi se ridică la 5 mA, 250 V pentru fiecare tub.

Se urmărește progresia albastrului de bromfenol și cînd acesta ajunge la aproximativ 1/4 de la nivelul inferior al țubului (aproximativ 2 ore) se întrerupe curentul.

e. Evidențierea fracțiunilor
electroforetice

Gelul se scoate din tub cu ajutorul unei seringi cu ac lung umplută cu tampon. Gelurile sînt introduse întîi într-o soluție de acid acetic 1 M pentru fixare și apoi sînt colorate cu albastru de metilen 0,2 % în acid acetic 1 %.

Decolorarea se face prin spălare cu acid acetic 1 % sau se folosește procedeul de decolorare electroforetică.

Analiza fotometrică se efectuează astfel: gelul este introdus într-o cuvă și acoperit cu tampon. Valoarea zero se obține folosind o porțiune transparentă a gelului.

De asemenea coloana de gel se poate secționa în discuri mici care se introduc în eprubete cu 0,5 - 1 ml tampon; se lasă peste noapte la rece sau la temperatura camerei. A doua zi se recoltează lichidul eluant și se repetă eluția. Din acest eluat se pot lua probe pentru analiza spectrofotometrică.

Acizii nucleici se pot recupera prin precipitarea eluatului cu 2,5 - 3 volume de etanol la -20°C .

CROMATOGRAFIE

Principiu

Metoda cromatografică a fost definită ca o metodă de analiză care se bazează pe separarea componentilor unui amestec de analizat, prin migrarea moleculelor acestor componente între faza mobilă sau purtătoare și cea staționară sau fixă. Moleculele vor migra cu viteze diferite, corespunzătoare funcției de separare a componentilor respectivi, fixându-se la diferite distanțe de start după solubilitatea lor în dizolvantul folosit. Această migrare va avea ca rezultat separarea componentilor în zone sau benzi bine distincte.

Identificarea și determinarea cantitativă a componentilor separați se realizează prin diferite metode adecvate componentilor și tehnicii cromatografice folosite.

Procesul general al cromatografiei necesită următoarele etape:

1. Alegerea hîrtiei cromatografice
2. Alegerea sistemului de solvenți
3. Alegerea tehnicii cromatografice
4. Prepararea probelor și cromatografierea lor
5. Uscarea cromatogramei
6. Localizarea și identificarea substanțelor de pe cromatogramă
7. Determinarea cantitativă a substanțelor

lor cromatografiate

8. Păstrarea cromatogramei.

Tehnica operatorie în metoda cromatografiei pe hîrtie

Pe o fîșie de hîrtie cromatografică Whatman, Schleicher Schull sau Munktell, de dimensiuni în funcție de metoda cromatografică folosită, se trasează cu creionul linia de start, la o distanță convenabilă de la capătul fîșiei de hîrtie. Pe linia de start, cu ajutorul unei micropipete, se va aplica soluția probei de analizat. Se lasă să se usuce hîrtia după fiecare porțiune aplicată, apoi se va introduce hîrtia într-o cameră cromatografică. Camera conține faza mobilă numită eluant sau developant, fiind saturată cu vaporii dizolventului.

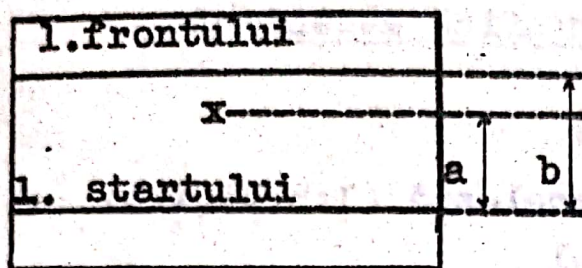
Pentru faza mobilă se folosesc o serie de rețete în care intră diferiți solvenți sau amestecuri de solvenți.

S-a constatat că viteza de curgere a fazei mobile este cu 5-15 % mai mare în direcție longitudinală, crescînd cu porozitatea hîrtiei.

După ce faza mobilă a parcurs o anumită distanță, numită linia frontului, se scoate hîrtia din camera cromatografică și se usucă. După uscare se revelează substanțele separate prin pulverizare cu un reactiv de culoare specific.

Pentru identificarea substanțelor separate se folosește o constantă fizico-chimică numită R_f . R_f - ul este raportul între distanța de la linia de start la centrul spotului sau petei obținute și

distanța străbătută de faza mobilă sau front.



$$R_f = \frac{a}{b}$$

R_f - ul poate avea valori cuprinse între 0 și 1 .

R_f - ul are o mare importanță în alegerea solventului potrivit, pentru ca separarea componentelor să fie cât mai bună. Valoarea sa în același sistem de solvenți este influențată de tehnica de migrare, calitatea hîrtiei folosite, durata de păstrare a amestecului de solvenți utilizați, prezența altor substanțe în proba de analizat, temperatură, etc.

Pentru identificări precise se folosesc substanțe etalon (standard), care se cromatografiază paralel sau împreună cu soluția de analizat.

O altă metodă de identificare este metoda chimică, prin care se determină cantitativ substanțele separate cromatografic. În această categorie intră metoda de identificare prin eluare, în care dozările cantitative se fac în eluatele de substanțe extrase de pe cromatogramă. Ca eluant se folosește un solvent în care substanțele de determinat sînt solubile și stabile.

Toate metodele de determinare cantitativă trebuie să se efectueze comparativ cu soluția etalon supusă cromatografierii în aceleași condiții cu proba.

SEPARAREA SI IDENTIFICAREA AMINOACIZILOR
DINTR-UN AMESTEC PRIN CROMATOGRAFIE PE HIRTIE

I. Metoda cromatografică ascendentă

Reactivi

1. Solvent: acid acetic- butanol-apă (1:5:4)(v/v)
2. Ninhidrină 0,5 % în butanol
3. Sol. CdCl_2 0,5 % în metanol 60 %
4. Amestec de aminoacizi, de concentrație cunoscută (0,05 g /100 ml sol.), pentru curba etalon

Modul de lucru

Din hîrtie de filtru Schleicher-Schull 2043 b Mg.1, se vor tăia benzi subțiri de 5/25 cm. Se va trasa linia de start la 2 cm de unul din capete. Se va pipeta pe mijlocul liniei de start soluția de analizat, care să conțină 5-25 μg din fiecare aminoacid și se va iriga hîrtia într-o cameră cromatografică, cu solvent acid acetic-butanol-apă. Irigarea va dura pînă cînd frontul solventului va ajunge la 2-3 cm de capătul de sus al hîrtiei. Se va usca apoi hîrtia și se va pulveriza colorantul, ninhidrină 0,5% în butanol, uscîndu-se din nou la temperatura camerei sau în etuvă la o temperatură de 60°C . Vor apare spoturile caracteristice fiecărui aminoacid, de culoare albastră caracteristică colorantului folosit.

Se decupează apoi fiecare spot și se taie în fîșii foarte înguste, introducîndu-se fiecare spot în cîte o eprubetă. Se adaugă 1 ml soluție de clorură de cadmiu în metanol, se agită puțin și se

adaugă 9 ml alcool etilic 60 %.

Eluatele astfel obținute se fotometrează la 530 nm, cuve de 1 cm.

Din datele obținute se va determina concentrația fiecărui aminoacid, făcându-se în același timp și o curbă etalon, corespunzătoare fiecărui aminoacid.

$$\text{Aminoacid \%} = \frac{c \cdot v}{n \cdot A \cdot 10^4} \quad \text{în care:}$$

c = cantitatea de aminoacid din probă, determinată din curba de etalonare ($\mu\text{g/probă}$).

v = volumul de soluție de aminoacizi preparată (ml)

n = volumul de soluție de analizat, măsurat pe cromatogramă (ml).

A = cantitatea de aminoacid luată în lucru (g)

Aminoacizii separați se pot identifica și după R_f -urile măsurate la martorii corespunzători.

Obținerea curbei de etalonare:

Se procedează identic cu proba, pipetându-se pe linia de start un volum exact măsurat de soluție care conține o cantitate cunoscută de aminoacizi.

După apariția spoturilor caracteristice fiecărui aminoacid, se decupează spoturile și se aduc în soluție, ca la proba de analizat. Se fotometrează în aceleași condiții și se trasează curba etalon pentru fiecare aminoacid separat, în coordonatele: absorbție (A) și μg acid aminic în probă.

II. Metoda cromatografică circulară

Reactivi

1. Solvent: 20 ml alcool butilic normal, 5 ml acid acetic glacial, 25 ml apă, se amestecă într-o pîlmie de separare și se folosește stratul superior de acid acetic cu butanol, saturat cu apă.
2. Sol. de ninhidrină 0,1 % în alcool butilic saturat cu apă.
3. Sol. M/100 de acid glutamic, alanină și leucină în alcool izopropilic 10 %
4. Sol. M/100 acid glutamic în alcool izopropilic
5. Sol. M/100 alanină în alcool izopropilic
6. Sol. M/100 leucină în alcool izopropilic
7. Două cutii Petri drept camere cromatografice și un disc de hîrtie cromatografică cu diametrul mai mare cu 1 cm decît cel al cutiei Petri.

Modul de lucru

Se efectuează un șablon transparent cu 5 orificii, unul central și patru radiale. Se așează șabloul peste hîrtia cromatografică și se trasează orificiile. Se sparge semnul central cu o baghetă cu diametrul de 0,5 cm. Se face un fitil tot din hîrtie cromatografică de dimensiunile 3-4/2 cm și se introduce fitilul în orificiul central al hîrtiei cromatografice, pînă la 3/4 din lungimea lui.

Pe unul din cele patru semne radiale se aplică cu o micropipetă, o picătură (0,002 ml) din soluția amestecului de cercetat, iar pe celelalte trei semne cîte o picătură din fiecare aminoacid care joacă rol de aminoacid standard. Se usucă hîrtia

în aer ,apoi se așează rondela cu capătul lung al fitilului în jos pe cutia Petri. Aceasta conține solventul care se ridică prin fitil, răspîndindu-se circular în hîrtia cromatografică.

După ce frontul solventului va avea un diametru de 6-7 cm, se scoate și se usucă hîrtia cromatografică în aer sau la termostat($70-80^{\circ}\text{C}$), pentru îndepărtarea solventului. Se dezvoltă prin pulverizare cu o soluție de ninhidrină 0,1 %, uscîndu-se din nou la termostat ($80-100^{\circ}\text{C}$), timp de 5-10 minute.

După uscare vor apărea în cazul amestecului de analizat trei benzi caracteristice fiecărui aminoacid, sub formă de arcuri de cerc colorate în roșu-violet. În cazul soluțiilor etalon, va apărea cîte un arc de cerc izolat.

Se vor identifica cei trei aminoacizi după R_f -urile soluțiilor etalon.

CROMATOGRAFIA PE GEL

Cromatografia pe coloană beneficiază de avantajul de a utiliza o aparatură relativ simplă și totodată rezultatele obținute astfel sînt de foarte multe ori mai bune ca cele dobîndite prin metode mai costisitoare.

Metoda cromatografiei pe gel se bazează pe o proprietate nouă, aceea a diferențelor în privința dimensiunilor moleculare unde principalul fenomen este separarea substanțelor cînd sînt spălate de către un lichid ce trece prin coloană.

Pentru obținerea separării, în cazul cromatografiei pe gel, suportul (care constă din particule de o mărime minimă) se găsește închis în coloană. Spațiul dintre particule este ocupat de un lichid ce fluxează prin suport. Componentii de separat sînt purtați prin suport de fluxul acestui lichid.

Cromatografia pe gel separă substanțele după mărimea lor moleculară, moleculele mari vor trece primele prin suport iar cele mai mici vor fi întîrziate.

Echipamentul pentru diferitele feluri de cromatografie variază foarte mult și situația din comerț este în schimbare rapidă, de aceea nu se poate da o listă completă a instrumentelor, ci mai curînd un tablou al acestuia și discuții asupra avantajelor și desavantajelor diferitelor tipuri.

Coloana cromatografică constă dintr-un tub drept cu un strat suport la partea inferioară. Suportul este permeabil pentru a permite lichidului să treacă în timp ce materialul stratului este reținut. Sub suport trebuie să existe un dispozitiv care să permită colectarea efluentului. Partea superioară a coloanei trebuie să permită legătura cu rezervorul eluantului.

Coloanele cromatografice cele mai perfecționate, special construite pentru cromatografia pe gel, pot fi obținute de la diverse firme.

Următoarele proprietăți sînt esențiale unei coloane destinate cromatografiei pe gel:

- volum mort mic, sub stratul suport,
- ușurință pentru legătura dintre ieșirea din coloană și un tub capilar,
- stratul suport nu trebuie să se infunde cu gel
- protejarea suprafeței stratului
- lipsa materialelor ce pot denatura substanțele labile.

Echipamentul pentru reglarea fluxului

În majoritatea lucrărilor cromatografice, umplerea cu eluant prin gravitate este destul de satisfăcătoare. În acest caz este necesar un rezervor (Mariotte flask) pentru a păstra o presiune de lucru constantă asupra coloanei.

În experiențele de precizie, reglarea optimă se face cu o pompă cu dispozitiv de reglare. Pentru cromatografia la scară de laborator sînt de

preferat pompele peristaltice.

Pentru înregistrarea curbelor de eluție sînt necesare înregistratoare și analizoare automate.

Majoritatea înregistratoarelor folosite în aplicațiile biochimice se bazează pe proprietățile spectrale ale soluțiilor. Proteinele și acizii nucleici au o puternică absorbție în ultraviolet și pot fi imediat detectate prin fotometrare.

Colectoare de fracțiuni

Substanțele separate pe suportul cromatografic trebuie să fie colectate separat. Această operație se efectuează prin conectarea ieșirii din aparatul cromatografic prin valve, la diferite containere pentru diferitele vîrfuri eluate. Echipamentul necesar unei colecții automate de probe nu reprezintă o modalitate generală și în majoritatea lucrărilor de laborator se preferă colectarea efluentului în fracțiuni egale.

Un colector de fracțiuni, introdus în ultimul timp, este acela în care eprubetele sînt așezate în grătare drepte, trecînd sub ieșirea din coloană sau coloana se mișcă deasupra eprubetelor. Aceasta a adus o mare economie de spațiu și ușurează mînuirea fracțiunilor după terminarea experiențelor.

Termostate

Dacă temperatura camerei unde se efectuează experiențele cromatografice este destul de constantă nu este necesar controlul temperaturii coloanei.

La lucrările foarte precise cum este determinarea greutateii moleculare este necesară termotatarea.

Tuburi de legătură.

Pentru evitarea reamestecului, tubul de legătură trebuie să aibă lumenul îngust. În cazul soluțiilor apoase se întrebuintează tubul din PVC cu diametrul interior de circa 1 mm. În anumite situații se mai pot folosi tuburi de Tygon sau silicon.

Majoritatea echipamentelor pentru cromatografia pe gel au racordurile convenite, ca echipament standard la eliberare și în acest caz nu sînt dificultăți pentru legături.

Modul de lucru

a) Alegerea tipului de gel

Se utilizează pe scară largă gelurile pe bază de Dextran - Sephadex și cele pe bază de poli-acrilamidă - Bio-Gel-P.

Sephadexul este o substanță obținută prin combinarea dextranului cu epiclorhidrina care conduce la formarea de legături încrucișate între moleculele de dextran filiforme, obținînd astfel o rețea tridimensională.

Porozitatea gelului se exprimă în g apă reținută de g gel uscat. Cu cît porozitatea este mai mare cu atît cantitatea de apă reținută este mai mare. Din cauza numărului mare de grupări OH,

pulberea de gel amestecată cu apa sau soluțiile saline se îmbibă rapid formînd un gel care este insolubil în apă. Este stabil într-un interval larg de pH.

Alegerea gelului se face în funcție de natura substanței de separat.

Pentru separările destinate îndepărtării solviților cu greutate moleculară mică din soluțiile de proteine se folosesc: Sephadex G-25, G-50, Bio-Gel P-6.

Pentru proteinele cu greutate moleculară mai mare decît 30.000 - 50.000 se folosesc gelurile care se umflă mai mult, cum este Sephadex G-50.

Pentru desalinizarea peptidelor și a altor substanțe de greutate moleculară mică se poate folosi Sephadex G-10, G-15, Bio-Gel P-2.

b) Prepararea gelului

Sephadexul și Bio-Gelul sînt furnizate sub formă de pulbere uscată. Înainte de folosire se va face umflarea lor în lichidul ce va fi folosit ca eluant. Cantitatea necesară de pulbere uscată, calculată din volumul coloanei cromatografice, este cîntărită înainte de umflare.

Metoda clasică de umflare a pulberii este de a fi lăsată în repaus pînă cînd gelul se umflă la echilibru. Pentru aceasta este necesară o perioadă lungă de timp. Pentru accelerarea procesului, cea mai convenabilă este "metoda încălzirii" într-o baie de apă fierbinte la 100°C, cînd umflarea este mult grăbită și poate fi completă în 2 ore.

c) Impachetarea coloanei

Cea mai obișnuită metodă de împachetare a coloanei este aceea în care la partea de sus a coloanei se atașează o pîlnie. Coloana este umplută cu eluant și un șlam subțire al materialului cromatografic (gelul) care curge din pîlnie. Acest material sedimentează în mod gradat în coloană și se așează în strat. În general încărcarea coloanei diferă în funcție de tipurile de gel.

d) Introducerea probei.

Amestecul de purificat trebuie să îndeplinească condițiile: să fie cuprins într-un volum cât mai mic de soluție pentru a permite separarea cât mai completă, să nu aibă vîscozitate mare. Proba se introduce direct pe suprafața gelului sedimentat.

e) Eluția

Eluentul se alege la rîndul său în funcție de natura chimică a substanței de analizat: apa distilată, ser fiziologic, soluții tampon. Ceea ce este caracteristic pentru filtrarea în gel este faptul că eluția se face cu același eluant pentru toate componentele amestecului. Eluția se realizează la presiune constantă și temperatura laboratorului. Separarea este proporțională cu înălțimea stratului de gel.

f) Colectarea fracțiunilor se face în volume egale.

g) Examinarea fracțiunilor se face prin metode fizico-chimice. Pentru proteine utilizăm

spectrofotometria în UV la 280 nm iar pentru enzime, activitatea enzimatică.

h) Regenerarea coloanei. După utilizare, gelul se spală cu apă sau cu tampon, se lasă pentru depunerea particulelor și se îndepărtează particulele nedepuse. Se repetă operația de câteva ori și apoi gelul se introduce din nou în coloană.

DESALINIZAREA PREPARATIVA A UNEI SOLUTII DE PROTEINA PE SEPHADEX G-50 MEDIUM

Necesar

1. Coloană cromatografică 26/40 (K)
2. Rezervor 25/26 (R)
3. Adaptor
4. Valvă de laborator cu 3 căi (LV-3)
5. Eprubete pentru colectarea fracțiunilor
6. Sephadex G-50 Medium 16 g în 210 ml soluție NaCl
7. Soluție 9 g % NaCl - 500 ml -
8. Proba, 50 ml (conține 3 mg/ml carboxyhemoglobină și 0,5 mg/ml cromat de potasiu).

Modul de lucru

Se împachetează coloana cu gel Sephadex G-50 Medium, se lasă să se stabilizeze la cea mai înaltă presiune de lucru posibilă. Se oprește fluxul.

Se îndepărtează partea superioară a coloanei și se montează pe stativ valva cu trei căi. Se conectează, pe rând, valva cu rezervorul și cilindrul

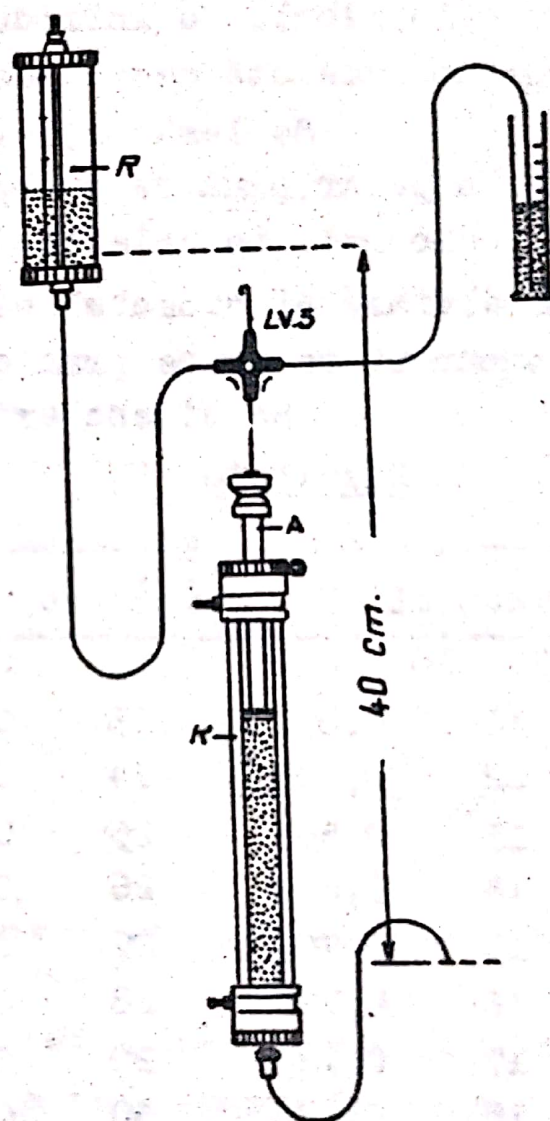
care conține proba. La efectuarea acestor legături nu se strâng șuruburile prea tare. Se atașează adaptorul la coloană și se leagă cu a treia cale a valvei.

Se ajustează nivelul lichidului în coloană cu 1-2 mm mai jos de capătul tubului coloanei.

Se introduce adaptorul în coloană în așa fel ca pistonul să aibă o poziție înclinată pentru a evita eventualele bule de aer între piston și pătura de lichid.

Se împinge pistonul ușor în jos în coloană în așa fel ca aerul de pe tuburile de legătură să fie trecut în rezervor.

Se rotește valva de pe eluție pe probă și îndepărtăm aerul și din acest tub. Se înșurubează piesa finală a adaptorului pe capătul coloanei. Se ajustează adaptorul imediat la suprafața stratului de gel și se lasă apoi în repaus 5 minute, pentru stabilizare.



Se umple rezervorul eluantului cu NaCl 9 g %, se astupă partea superioară a acestuia și se ajustează fluxul pentru a avea presiunea optimă de lucru (40 cm de la rezervor la capătul de colectare a fracțiunilor). Se introduce proba, 50 ml, la o presiune mai scăzută decât cea pentru eluție.

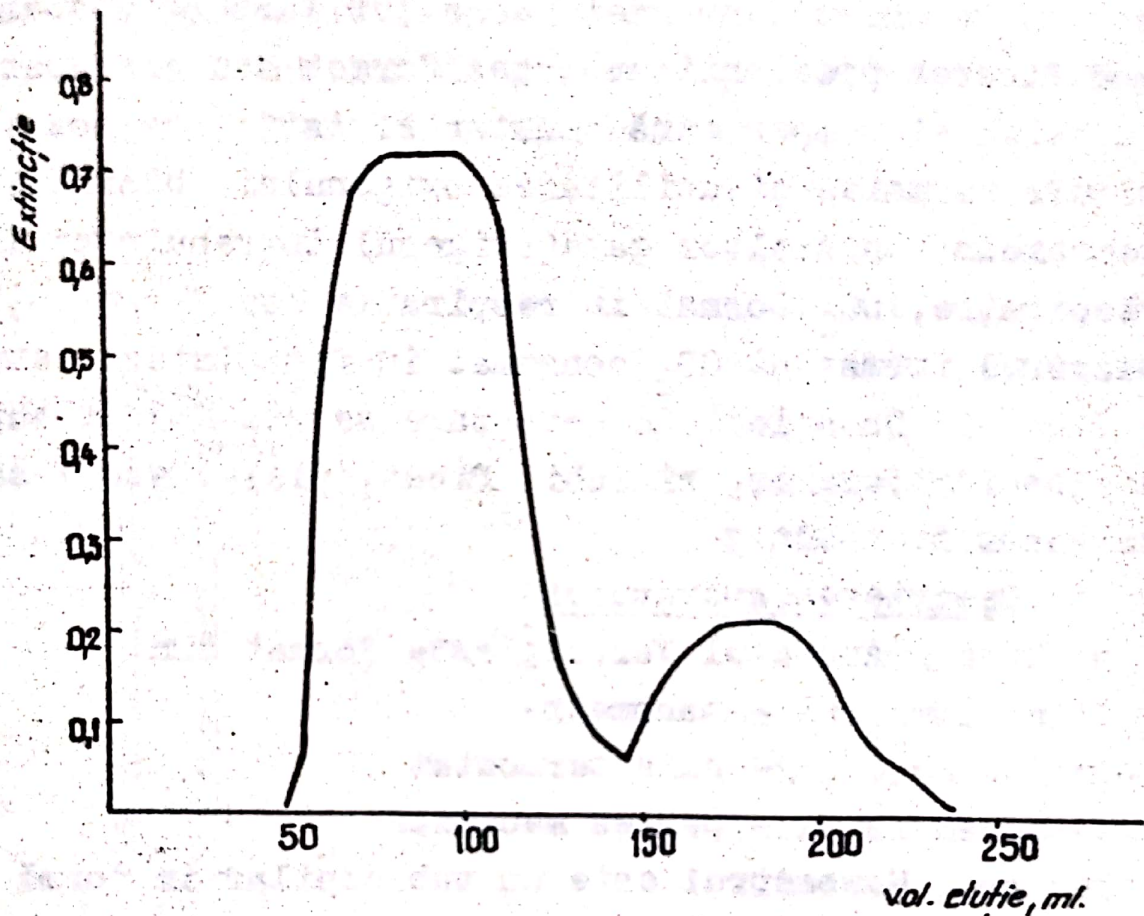
Se lasă primii 50 ml eluant să curgă într-un pahar pînă ce proba ajunge la capătul de jos al coloanei. Se colectează fracțiuni de cîte 5 ml pînă se eluiază și cromatul de potasiu care este ultimul component ce trece prin coloană.

Se citesc extincțiile fracțiunilor.

Rezultate

Nr. fracției	E	Nr. fracției	E	Nr. fracției	E
1 - 10	-	22	0,620	34	0,212
11	0,071	23	0,475	35	0,216
12	0,505	24	0,315	36	0,219
13	0,565	25	0,210	37	0,219
14	0,680	26	0,140	38	0,215
15	0,700	27	0,093	39	0,205
16	0,720	28	0,075	40	0,181
17	0,720	29	0,069	41	0,141
18	0,720	30	0,105	42	0,100
19	0,720	31	0,142	43	0,075
20	0,720	32	0,179	44	0,065
21	0,695	33	0,200	45	0,055
				46	0,035

Se trasează curba de eluție.



După volumul în care proteina a fost eluată se poate estima diluția fracției proteice.

În cazul experienței noastre, volumul de carboxyhemoglobină de 50 ml a fost eluat în 85 ml realizând o diluție de 1,7.

RESPIRATIA TISULARA

Principiu

Metoda manometrică a lui Warburg măsoară modificarea presiunii unui gaz format sau consumat la volum și temperatură constantă. Astfel se poate măsura formarea și utilizarea oxigenului, bioxidului de carbon sau a altor gaze (oxigenul întrebuintat în respirație, CO_2 format în respirație sau fermentație, oxigenul format și CO_2 consumat în fotosinteză, etc)

Ca obiect de cercetare se pot folosi cupe de țesuturi (creier, rinichi, ficat, piele, etc.) sau omogenat de țesut.

Descrierea aparatului

Aparatul Warburg este format din:

- manometre
- baie termostat
- partea mecanică

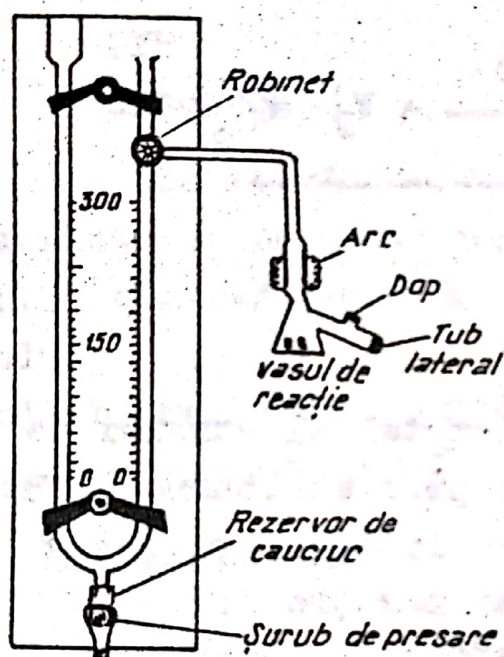
Manometrul este un tub capilar în formă de U ale cărui ramuri sînt gradate în mm (0 - 300). Curbura inferioară a manometrului este prevăzută cu un tub scurt de cauciuc plin cu soluție Brodie, lichid care nu intră în reacție cu gazele desvoltate.

Lichidul Brodie are următoarea compoziție:

Taurocolat de sodiu	5 g
clorură de sodiu	23 g
albastru Evans(200 mg ‰)	5 ml
sol. alcoolică saturată de timol	10 picături

Ramura dreaptă a manometrului este liberă iar cea stîngă comunică, prin intermediul unui robinet

direct cu vasul de reacție și indirect, cu exteriorul. Intregul dispozitiv este fixat pe un suport metalic care este prevăzut la partea inferioară cu un sistem de presare a tubului de cauciuc, permițând ridicarea și coborîrea lichidului din manometru.



Vasul de reacție este un flacon conic prevăzut cu o cuvă centrală, iar lateral cu unul sau două diverticule. Legătura dintre vasul de reacție și manometru se face cu ajutorul unui șlif. Suportul metalic al manometrului este prevăzut cu un dispozitiv ce permite adaptarea la mecanismul de agitare a băii ter-

mostat a aparatului Warburg.

Baia termostată este un vas de sticlă groasă de formă circulară sau dreptunghiulară în care se cufundă vasele de reacție.

Partea mecanică asigură pe de o parte menținerea unei temperaturi constante în baia termostată, iar pe de altă parte produce o agitare

continuă a întregului sistem.

Pentru controlul variațiilor de temperatură și presiune atmosferică este necesară folosirea unui termobarometru.

Constanta vasului de reacție și a manometrului pentru determinarea consumului de oxigen se calculează după formula:

$$K_{O_2} = \frac{V_G + \frac{273}{T} + V_F \cdot \alpha_{O_2}}{P_o}$$

în care:

$$V_G = V_T - V_F$$

(V_T este volumul total al vasului de reacție calculat prin etalonare cu Hg pînă la diviziunea 150).

V_F = volumul lichidului de reacție

$$T = 273 + 37,5^\circ \text{C} = 310,5^\circ \text{C}$$

$\alpha_{O_2} = 0,027$ (coeficient de solubilitate al oxigenului în apă)

$$P_o = 10.000 \text{ mm sol. Brodie}$$

Pentru alte gaze, coeficientul α are următoarele valori:

	25°C	38°C
oxigen	0,029	0,024
azot	0,015	0,013
bioxid de carbon	0,760	0,560
oxid de carbon	0,021	0,018

Reactivi

1. Mediu de incubare:

K_2HPO_4	16,4	mM
KH_2PO_4	3,6	mM
$NaHCO_3$	25,0	mM
KCl	85,0	mM
$MgCl_2$	5,0	mM
zaharoză	42,0	mM
ATP	1,3	mM
citocrom C	11,0	mM

Se solvă toate substanțele în 5 ml apă bidistilată și se corectează pH-ul la 7,4 .

2. Sol. zaharoză 0,25 M, pentru efectuarea omogenatului

3. Sol. hidroxid de potasiu 20 %

4. Sol. de glucoză $5 \cdot 10^{-3}$ M, în concentrație finală

Modul de lucru

Se introduce în cuva centrală a vasului de reacție hîrtia de filtru rulată și tăiată după mărimea cuvei.

Se pipetează în compartimentul principal al vasului de reacție toate soluțiile cu excepția omogenatului (se păstrează vasele de reacție pe gheață în tot timpul operațiunilor premergătoare determinării consumului de oxigen).

Se pipetează, dacă este cazul, soluția în diverticulul lateral.

Se pipetează omogenatul în compartimentul

central.

Se pipetează 0,15 - 0,20 ml soluție hidroxid de potasiu 20 %, în cuva centrală.

Se ung dopurile de la diverticul și rodalele cu manometrul cu vasilină neutră.

Se adaptează vasul de reacție la manometru și se introduc manometrele cu robinetul deschis în baia termostat.

Se egalizează temperatura prin agitare timp de 4 minute cu o amplitudine de 7 cm și frecvența de 80 - 100 bătăi/ minut.

Se închid robinetele și se fixează lichidul în manometru până la punctul considerat de noi 0 (zero), sau 150 mm, prin manevrarea vizei de presiune.

Se agită timp de trei minute pentru egalarea presiunilor.

Se ajustează nivelul lichidului în brațul deschis al manometrului la diviziunea 150mm

Se citește imediat nivelul lichidului în brațul deschis al manometrului. Aceasta este citirea de zero.

Se citește după 10 , 20 , 30 minute.

Se face corecția termobarometrului.

Exemplu: Corecția citirilor pentru variațiile înregistrate de termobarometru

manometrul cu vasul de reacție		TB
0'	149	150
10'	120	148

diferența = 29 mm

diferența = 2 mm

Valoarea reală: $29 - 2 = 27$ mm

Se deschid robinetele, se scot manometrele din baia termostată.

Se calculează consumul de oxigen înmulțind diferența în mm cu constanta manometrului și raportat la unitatea de timp, în μ litri .

Observații

O condiție esențială în determinările la aparatul Warburg este curățirea sticlăriei.

Metodele de spălare depind de reacțiile și tipurile de enzime care se studiază. Deseori fragmentele de țesut sînt sensibile la contaminarea cu metale, sînt influențate de urme de vitamine sau alte substanțe organice. Se folosesc în acest scop trei metode:

- spălare cu bicromat de potasiu cald
- spălare cu acid azotic, în părți egale cu acid sulfuric
- spălare cu detergent (o lingură detergent la 4 litri de apă).

Înainte oricărei spălări este necesară o degresare a vaselor de reacție cu eter sau acetonă.

FOSFORILAREA OXIDATIVA.DETERMINAREA
RAPORTULUI P:O

Principiu

In prezența ADP și a fosforului anorganic mitocondriile oxidează diversele substraturi, pe care le cuplează cu formarea de ATP.

ADP se eliberează în reacția dintre glucoză și ATPexogen în prezența hexochinazei.

Determinând valoarea fosforului anorganic înainte și după respirația mitocondriilor și făcând raportul P:O se determină indirect cantitatea de ATP format.

Reactivi

1.Mitocondrii

2.Sol.KOH 20g%

3.Tampon TRIS-HCl 0,2M ,pH 7,4

TRIS

0,605 g

HCl conc.d=1,16

0,408 ml

Apă distilată pînă la

100 ml

4.Sol.MgSO₄ 0,0067 M

MgSO₄

0,825 g

Apă distilată

25 ml

5.ATP 1 μmol/ml

ATP

0,01246 g

Apă distilată pînă la

1 ml

6.Substrat (succinat) 15 μmoli/ml

Succinat

0,081 g

Apă distilată

1 ml

7. Sol. NaF 0,014 M

NaF

1,172 g

Apă distilată pînă la

100 ml

8. Citocrom c

Citocrom c

0,004 g

Apă distilată

1 ml

9. Tampon fosfat pH 7,4

0,1 ml conține 30 μ moli KH_2PO_4

4,08 g

Apă distilată

80 ml

KOH boabe pentru ajustarea
pH-ului la 7,4

12 bucăți

Se completează cu apă distilată la 100 ml

10. Hexochinază

11. Glucoză 0,03 M

Glucoză

10,8 g

Apă distilată pînă la

100 ml

12. Sol. molibdat de amoniu 2,5%

13. Sol. acid sulfuric 4 N

14. Etalon fosfat 0,4083 g%

15. Reactiv Fiske

Se face un amestec din:

0,2 g acid 1-amino -2-naftol-4-sulfuric

1,2 g HNaSO_3 1,2 g Na_2SO_3

Din amestec se cîntăresc în momentul întrebuintării

0,1 g și se dizolvă în 4 ml apă distilată.

Modul de lucru

In vasul de reacție Warburg ținut pe gheață se pipetează:

Tampon fosfat pH 7,4	0,1 ml
Tampon TRIS-HCl pH 7,4	0,3 ml
MgSO ₄	0,1 ml
ATP	0,1 ml
Substrat (succinat)	0,1 ml
Mitocondrii (9 mg proteină/ml)	0,5 ml
NaF	0,1 ml
Apă distilată	0,3 ml

In brațul lateral al vasului de reacție Warburg se pipetează:

Hexochinază	0,3 ml
Glucoză	0,1 ml

In compartimentul central se pune o rolă de hirtie de filtru și se pipetează 0,2 ml KOH 20% pentru a absorbi CO₂.

Se pipetează aceleași cantități ca mai sus într-o eprubetă în care s-a introdus mai întâi 0,5 ml acid tricloracetic 40% și 3,5 ml apă distilată, pentru a servi la determinarea fosforului anorganic la timpul zero (proba T₀).

In altă eprubetă se pipetează 1 ml sol. etalon fosfat + 4,5 ml apă distilată + 0,5 ml acid tricloracetic (proba etalon E),

Vasul de reacție Warburg se atașează la manometrul și se introduce în baia aparatului Warburg încălzită la 37°C. Se agită 5 minute cu robinetul des-

chis. Se aduce lichidul din manometru la 150 mm. Se răstoarnă conținutul brațului lateral în vasul de reacție. Se închide robinetul. Se agită încă 2 minute cu robinetul închis. Se citește timpul zero (T_0), se agită 20 de minute și se citește pe brațul drept al manometrului denivelarea, care se notează cu t . Se notează și denivelarea de la termobarometru.

Se scoate apoi vasul de reacție Warburg de la manometru, se aduce pe gheață și se adaugă imediat 0,5 ml acid tricloracetic 40% + 3,5 ml apă distilată (proba T)

Se face apoi reacția pentru fosfor anorg în proba T_0 , proba T și proba E.

Se agită cele 2 eprubete T_0 și E și cuva Warburg și se pipetează în alte eprubete câte 1 ml.

	T_0	T	E
	ml	ml	ml
Amestec	1	1	1
Apă distilată	3,5	3,5	3,5

Se centrifughează.

Supernatant	1	1	1
Molibdat de amoniu	1	1	1
H ₂ SO ₄ 4 N	1	1	1
Reactiv Fiske	0,1	0,1	0,1

Se agită, se completează după 20 minute cu 7 ml apă distilată. Se lasă în repaus 20 minute și se citesc apoi extincțiile la 660 nm.

Calcul

Calcul pentru fosfor

E_{T_0} = extincția probei la timpul zero

E_T = extincția probei după respirația mitocondriilor timp de 20 minute (cuplare ADP + P)

$$\frac{E_{T_0}}{E_{\text{etalon}}} \times 30 = E'$$

$$\frac{E_T}{E_{\text{etalon}}} \times 30 = e$$

$E' - e = \mu$ moli P din 0,5 ml mitocondrii. Se determină proteinele din 0,5 ml mitocondrii se împart la 6,25 și se află mg N corespunzători la 0,5 ml mitocondrii. Se află apoi cantitatea de fosfor corespunzătoare la 1 mg N

$$\frac{\mu \text{moli P din } 0,5 \text{ ml mitocondrii}}{\text{mg N din } 0,5 \text{ ml mitocondrii}} = \frac{\mu \text{moli P}}{1 \text{ mg N}} = P$$

Calculul pentru consumul de oxigen

$$\mu \text{atomi oxigen la } 20 \text{ minute} = \frac{a \times b}{c \times d}$$

a = consum de oxigen la 20 minute

b = constanta manometrului

c = coeficient de convertire în μ atomi de oxigen = 11,2

d = mg N proteic corespunzător la 0,5 ml mitocondrii.

Se face apoi raportul P:O

P:O = 2 în cazul folosirii succinatului ca substrat (substrat FAD dependent)

Pentru substrat NAD dependent raportul $P:O$ este egal 3.

DOZAREA PROTEINELOR DIN MITOCONDRII PRIN METODA BIURETULUI

Deproteinizarea se face cu un amestec ce conține:

45% etanol

25% eter

30% apă distilată

La 5 ml amestec se pun 0,1 ml mitocondrii.

Se centrifughează iar sedimentul se dizolvă în 1 ml NaOH 3%. Dacă este necesar se încălzește.

Se adaugă apoi 5 ml suspensie de $Cu(OH)_2$ obținută astfel:

1 ml $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 10% + 20 ml NaOH 3%

După 10 minute în care timp se agită de 2-3 ori, se centrifughează și se citește extincția la 555 nm.

Paralel se face și un etalon dintr-o soluție de albumină bovină 0,01 g/ml.

Se pipetează din soluția etalon 0,1 ml + 1 ml NaOH 3%. Se adaugă apoi 5 ml suspensie $Cu(OH)_2$.

Se citește extincția după 10 minute.

Calcul

$\frac{E_p}{E_{\text{etalon}}} = \text{mg proteină din 0,1 ml mitocondrii.}$

E_{etalon}

Se calculează pentru a aduce concentrația mitocondriilor la 7-9 mg proteină /ml (vezi prepararea mitocondriilor).

DOZAREA ACTIVITATII CITOCROMOXIDAZEI DIN RETICULOCITE

Principiul

Se măsoară manometric în aparatul Warburg consumul de oxigen în prezența citocromului c oxidat, folosind ca agent reducător para-fenilendiamina hidroclică.

Reactivi

1. Sol. tampon fosfat 0,2 M

A. 0,2 M NaH_2PO_4 (27,8 g %)

B. 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (53,65 g %) sau 71,7 g%
pentru $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

Se măsoară 19 ml sol. A + 81 ml sol. B pentru a
se obține pH = 7,4

2. Citocrom c 0,3 mM

3. Para-fenilendiamină hidroclică 0,2 M

Modul de lucru

În vasul principal de reacție Warburg se pipetează 0,2 ml tampon fosfat pH = 7,4, 0,3 ml citocrom c, 0,5 ml hemolizat reticulocite 1:1 proaspăt preparat și 0,7 ml apă bidistilată.

În brațul lateral se pipetează 0,3 ml para-fenilen diamină hidroclică.

Cuva centrală se echipează cu rolă de hîrtie de filtru plisată îmbibată cu 0,2 ml KOH 20%. După 5 minute de termoechilibrare la 37°C cu robinetul deschis, se răstoarnă conținutul brațului lateral în vasul principal.

Se aduce la 150 mm în ambele brațe, se închide comunicația cu exteriorul și se lasă 4 minute pentru termoechilibrare. Se face citirea la timpul zero (T_0).

După 15 minute se fac citirile în brațul drept al manometrului. Se fac apoi citiri succesive din 15 în 15 minute, timp de o oră.

Variațiile foarte mici ale presiunii atmosferice și ale temperaturii camerei, care determină variații ale presiunii gazului din cuvă, sînt corectate cu ajutorul termobarometrului. Citirile la termobarometru se fac simultan cu citirile la probe.

Variațiile citite la termobarometru se scad algebric din valorile citite la probă. (o scădere se scade, iar o creștere se adună la valoarea probei).

Scăderea presiunii oxigenului din cuvă este dată de variația înălțimii coloanei de lichid. Această înălțime h înmulțită cu k (constanta manometrului) ne dă volumul de oxigen consumat.

Calcul

Activitatea citocromoxidazei se exprimă în $\text{mm}^3\text{O}_2/\text{ml}$ hemolizat/oră.

$$V_{\text{O}_2} = h \cdot k \cdot 2$$

DOZAREA ACTIVITATII COLINESTERAZEI SERICE

Principiu

Colinesteraza în soluție de bicarbonat tamponat cu bioxid de carbon, la un pH= 7,3-7,4, acționează asupra acetilcolinei, cu punere în libertate a unei cantități corespunzătoare de acid acetic. Acidul acetic reacționează cu bicarbonatul, care va elibera o cantitate echivalentă de bioxid de carbon; acesta din urmă va fi apoi măsurat.

Reactivi

1. Sol. clorură de sodiu 0,9 %
2. Sol. clorură de potasiu 1,2 %
3. Sol. clorură de calciu 1,76 %
4. Sol. bicarbonat de sodiu 1,26 %
5. Sol. bicarbonat tamponat

sol. NaCl 100 ml

sol. KCl 2 ml

sol. CaCl₂ 2 ml

sol. NaHCO₃ 30 ml

6. Sol. acetilcolină clorhidrică 10 %

7. Substrat acetilcolină:

19 ml sol. bicarbonat tamponat + 1 ml sol.

aceticolină clorhidrică 10 %

Modul de lucru

În vasul de reacție se introduce substrat aceticolină 1,5 ml, iar în diverticolul lateral 0,5 ml ser. Paralel se face și un martor, fără ser, pentru a cunoaște hidroliza spontană a substratului. Amestecul

se face după ce întreg sistemul a luat temperatura băicare trebuie să fie de $37,5^{\circ}\text{C}$. Citirea denivelărilor se face după 60 minute.

Calcul

Calcularea cantității de CO_2 eliberat se face înmulțind diferența în mm dintre martor și probă cu constanta aparatului calculată pentru bioxid de carbon.

Rezultatele pot fi exprimate și în unitate de colinesterază, care reprezintă activitatea enzimatică a unui preparat seric ce pune în libertate într-o oră, la temperatura de 38°C , un cm^3 de CO_2 , indicând hidroliza a 7,5 mg acetilcolină. Se raportează la 1 ml ser.

M E T O D E S P E C I A L E

PREPARAREA LACTAT DEHIDROGENAZEI

Principiu

Lactat dehidrogenaza este separată prin fracționare cu sulfat de amoniu dintr-un extract apos de moschi de iepure.

Reactivi

1. Sol. KOH 0,03 M
2. Sol. EDTA 0,05 g %
3. Sol. saturată de sulfat de amoniu

Modul de lucru

Se taie capul unui iepure omorît prin lovire și se sîngerează bine. Se scot mușchii de la picioarele din spate și de pe spinare și se cîntăresc într-un vas tarat și răcit. După tocare (cu o mașină de tocat), carnea se amestecă cu un volum egal de soluție KOH 0,03 N care conține 0,5 g EDTA/l.

Se presează pasta de mușchi foarte bine pentru a scoate tot sucul. Pasta presată se amestecă cu un volum egal din aceeași soluție, se agită și se presează din nou.

Pasta rezultată la a doua presare se amestecă cu jumătate volum de apă distilată care conține 0,5 g EDTA %.

Se reunesc toate lichidele de la extracții (pH-ul trebuie să fie în jur de 7,2) și se adaugă un volum egal de soluție saturată de sulfat de amoniu la rece și se filtrează imediat prin filtru dublu. Soluția are o saturație de 50 % sulfat de amoniu.

Este important ca timpul dintre momentul sacrificării animalului și filtrarea extractului să nu depășească o oră și jumătate, deoarece activitatea enzimei scade.

Soluția saturată 50 % se aduce la saturația de 52 % cu o soluție saturată 100 % de sulfat de amoniu (la 100 ml soluție se adaugă 8 ml soluție sulfat de amoniu 100 %). Se aduce pH-ul soluției obținute la 8 prin adăugare de amoniac 25 %, picătură cu picătură și agitare continuă. Se lasă soluția în repaus și după o săptămână apar cristale strălucitoare, mătăsoase de aldolază, care se îndepărtează prin filtrare (3-4 hîrtii de filtru). Filtratul se aduce la saturația de 72 % prin adăugare de sulfat de amoniu cristale (la 100 ml soluție de saturație 52 % se adaugă 13 g sulfat de amoniu). La această saturație precipită LDH care este separat prin filtrare pe 2-3 hîrtii de filtru.

Se dizolvă precipitatul în 50 ml apă distilată rece, iar reziduiul insolubil rămas se elimină prin centrifugare. În supernatantul clar (aproximativ 70 ml), se adaugă în porțiuni mici și sub agitare continuă, 27 ml de soluție sulfat de amoniu saturată 100 %. Se menține 30 minute la temperatura camerei, timp în care soluția ajunge la temperatura de 15°C,

cînd precipită cea mai mare cantitate de enzimă.

Se centrifughează la rece și precipitatul se dizolvă în 100 ml apă distilată rece. Reziduul insolubil este îndepărtat prin centrifugare. Soluția rezultată este clară, galbenă, vîscoasă și prezintă o activitate LDH mare.

Se repetă fracționarea cu sulfat de amoniu, soluție saturată 100 %, în proporție 1:1 pînă se ajunge la un volum de 7,5 ml. Această fracțiune este stabilă timp de două luni la $+4^{\circ}\text{C}$.

Soluția este utilizată la dozarea în UV a unor enzime și metaboliți cum ar fi: transaminaze, piruvatkinază, acid piruvic, fosfoenolpiruvat, etc.

Înainte de utilizare, soluția concentrată de LDH se diluiază în soluție de sulfat de amoniu 2,4 M într-o proporție stabilită prin măsurarea activității în test optic.

PREPARAREA UREAZEI

100 g făină soia, degresată prin 3 - 4 extracții cu eter de petrol, se agită cu 500 ml apă distilată timp de jumătate de oră. Se lasă în repaus pentru 2 ore și apoi se centrifughează.

Din lichidul separat se precipită ureaza cu 10 volume acetonă. Precipitatul se separă prin filtrare pe pîlnie Büchner, la trompă de vid, și se usucă în exicator. Pulberea obținută se păstrează la $+4^{\circ}\text{C}$ și se utilizează pentru prepararea soluției cu activitate ureazică la dozarea ureei.

PREPARAREA HEXOKINAZEI

Principiu

Hexokinaza este extrasă din drojdie cu toluen și apoi fracționată cu sulfat de amoniu.

Reactivi

1. Toluen
2. Glucoză
3. Sulfat de amoniu
4. Sol. EDTA 0,001 M (0,3722 g ‰)

Modul de lucru

500 g drojdie presată se amestecă cu 30 ml toluen și se ține la baia de apă la 37°C pînă la lichefiere. Se adaugă 12,5 g glucoză / l de lichid. Se lasă peste noapte la 0°C și apoi se filtrează. La filtrat se adaugă sulfat de amoniu în proporție de 0,32 g /ml și se obține o saturație 55 %. Se agită pentru dizolvare, se lasă în repaus 1-2 ore, apoi se filtrează la rece. Filtratului 1 se adaugă 0,13 g sulfat de amoniu/ml pentru saturația de 75 %, se dizolvă, se lasă în repaus 4-6 ore, după care se filtrează la rece.

Precipitatul colectat cu o spatulă se amestecă cu aproximativ 2 volume de EDTA 0,001 M (aprox. 20 ml) și se dializează suspensia contra unei soluții EDTA 0,001 M, timp de două zile la rece (soluția de EDTA se schimbă de cîteva ori).

Materialul insolubil este îndepărtat prin centrifugare.

Soluția obținută prezintă activitate enzimatică de 2000-4000 unități/ml și poate fi păstrată la -20°C câteva luni. În această perioadă are loc o pierdere treptată a activității.

Preparatul este utilizat pentru determinarea raportului P:O a fosforilării oxidative.

EXTRACTIA ACIZILOR NUCLEICI

Considerații generale

Alegerea metodei de extracție a unui acid nucleic, depinde de scopul urmărit, precum și de materialul biologic de care dispunem.

Calitatea unui acid nucleic extras depinde de cel puțin patru factori principali și anume:

a) procedeul de distrugere a celulelor și de izolare a fracțiunilor subcelulare;

b) blocarea activității nucleazice a celulelor;

c) modul în care s-a evitat degradarea mecanică a macromoleculelor de acizi nucleici în timpul extracției;

d) agentul de disociere a acidului nucleic de formațiunile celulare cu care el este în mod obișnuit complexat.

În numeroase cazuri, o anumită metodă de extracție nu conduce la obținerea unui produs pur.

Acidul ribonucleic ribozomal (ARNr) sau acidul dezoxiribonucleic (ADN) sînt de obicei cînta-

minați cu acid ribonucleic mesager(ARNm), iar preparatele de acid ribonucleic de transfer (ARNt) conțin molecule de ARN cu greutate moleculară mică.

Este greșit să se considere că o extracție de acizi nucleici făcută cu scopul de a urmări o anumită activitate biologică poate fi condusă în așa fel încât preparatul să fie bogat în acizi nucleici, dar nu și purificat. Există riscul ca unele proprietăți atribuite acidului nucleic să aparțină de fapt impurităților. În momentul în care însă s-a dovedit că o anumită proprietate biologică este specifică doar acidului nucleic, și numai această proprietate ne interesează, atunci purificarea totală a acidului nucleic nu este obligatorie.

Cel mai frecvent, preparatul de acid nucleic este contaminat cu proteine. Utilizarea fenolului, a detergenților sau a unor săruri în anumite condiții experimentale determină disocierea acizilor nucleici de proteine.

O atenție mai mică decât cea acordată proteinelor se atribuie ionilor metalici prezenți în preparatele de acizi nucleici. Aceștia însă modifică substanțial atât conformația, cât și activitatea biologică a acizilor nucleici. În special ionii metalelor bivalente sînt frecvent prezenți în preparatele de acizi nucleici. Se pot aplica două soluții pentru a-i îndepărta; a) dializa preparatului contra EDTA și b) utilizarea coloanelor schimbătoare de ioni sau a gel-filtrării.

Acizii nucleici în general și acizii ribonucleici în special sînt extrem de sensibili față de nucleaze. Cele mai mari dificultăți le creează diferite tipuri de ribonucleaze (RN-aze) ce contaminatează preparatele de ARN.

Atît fenolul cît și dodecilsulfatul au un efect limitat anti-RN-azic. Adăosul de bentonită determină ca preparatele obținute de ARN să fie lipsite de RN-aze.

În timpul extracției cu fenol trebuie să se aibă grijă ca interfaza dintre stratul apos și cel fenolic să nu se deranjeze, deoarece concentrația cea mai mare de RN-aze se găsește la interfață și ea poate trece în faza apoasă.

Izolarea subfracțiunilor celulare

Extracția acizilor nucleici din diferite țesuturi sau subunități celulare, astfel ca ei să nu fie alterați în timpul extracției, impune luarea unor măsuri speciale.

O atenție egală trebuie acordată atît metodei de omogenizare a țesutului, cît și menținerii pH-ului și molarității în limite fiziologice, iar temperatura și turația în timpul centrifugării se vor respecta în limitele admise.

Cercetări de izolare a subunităților celulare și controlul acestora, au arătat marea lor sensibilitate, atît morfologică, cît și funcțională, atunci cînd sînt extrase din celule.

Pentru acest motiv, timpul dintre recolta-

rea țesutului și prelucrarea lui ulterioară trebuie să fie cât mai scurt.

În cazul extracției unor acizi nucleici din unele organe se recomandă perfuzarea organului cu zaharoză 0,25 M și CaCl_2 0,0018 M pentru a îndepărta sîngele pe care îl conține. Această precauție este necesară deoarece datele obținute pot fi influențate de prezența elementelor sanguine, care în cazul ficatului de șoarece pot constitui 30 % din greutatea sa.

EXTRACTIA ACIDULUI RIBONUCLEIC

(Metoda L.M.Popa)

Reactivi

1. Sol. clorură de sodiu 9 ‰

2. Tampon Slam, pH 5,4

$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1,36 g
---	--------

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,242 g
---	---------

$\text{LiCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	8,456 g
--	---------

Dodecilsulfat(DDS)	5,0 g
--------------------	-------

Apă distilată pînă la	1000 ml
-----------------------	---------

3. Fenol saturat cu apă

90 g fenol proaspăt distilat se dizolvă în 10 ml apă bidistilată și după solvire se mai adaugă 100 ml apă bidistilată. Se agită amestecul într-o pîlnie de separare și se lasă în repaus 24 ore la întuneric. După separarea completă a straturilor, se colectează stratul inferior într-o sticlă brună.

Soluția saturată de fenol se conservă la $+4^{\circ}\text{C}$ și poate fi utilizată 15 - 20 zile. Înainte de utilizare se agită bine flaconul.

4. Eter pro narcosi

5. Alcool etilic absolut

6. Acetat de sodiu 3M

7. Tampon tris 0,005 M pH = 7,6 care conține NaCl
0,05 M

8. NaCl cristale

Se recoltează organul (ficat sau creier), se spală în ser fiziologic și se cântărește. Se pregătește un omogenat 1/10 în ser fiziologic, care se centrifughează la rece la 800 t/min, timp de 15 minute. La supernatant se adaugă 0,5 volume tampon Slam și 1,5 volume fenol saturat, se agită 10 minute și se centrifughează la rece timp de 15 minute la 2200 t/min. Se obțin trei straturi: stratul superior conține acizii nucleici, stratul mijlociu este format din proteine, iar stratul inferior din fenol. Se colectează stratul superior cu o pipetă efilată și se tratează cu un volum dublu de eter. Se agită și se lasă în repaus pentru separarea a două straturi: stratul inferior conține fenolul extras în eter, iar stratul inferior, acizii nucleici. Se repetă operația de extracție cu eter cu stratul inferior, pentru îndepărtarea urmelor de fenol.

Acidul ribonucleic total se precipită prin adăugarea a două volume de alcool etilic absolut, rece, în prezența acetatului de Na 3 M (3 picături/ml), se

lasă la congelator la -14°C peste noapte. A doua zi se centrifughează.

Pentru separarea ARNr din ARN total, precipitatul obținut se separă prin centrifugare 20 - 30 minute la 2200 t/min, și se dizolvă în tampon tris 0,005 M (reactivul 7). La soluția obținută, se adaugă clorură de sodiu cristale până se ajunge la o concentrație de 2 M; se lasă la $+4^{\circ}\text{C}$ peste noapte.

Precipitatul rezultat conține ARNr, iar în supernatant rămâne ARNs care se poate separa prin precipitare cu două volume de alcool etilic absolut.

Pentru verificarea purității preparatelor obținute se citește absorbția optică la 260 și 280 se face raportul E_{280}/E_{260} care trebuie să aibă o valoare cuprinsă între 0,45 - 0,48. Când valoarea raportului este mai mare, apropiindu-se de unitate, preparatul este contaminat cu proteine.

EXTRACTIA ACIDULUI DEZOXIRIBONUCLEIC

Reactivi

1. Sol NaCl 0,15 M
2. Sol dodecilsulfat (DDS) 5 % în alcool 45 %
3. Alcool etilic 95 , 80 , 70 %
4. NaCl cristale

Modul de lucru

Se spală celulele sau țesutul cu soluție de clorură de sodiu 0,15 M, se cântărește și se

omogenizează. Se centrifughează 5 minute la 2500 t/min. și sedimentul se dispersează imediat în NaCl 0,15 M în proporție de 1/10. Se adaugă 4,5 ml soluție DDS. Când suspensia celulară devine vâscoasă, se adaugă NaCl cristale, sub agitare continuă, până la concentrație finală de 1M. Se prelungește agitarea până la o oră, la temperatura camerei.

Se centrifughează la 3000 t/min. timp de 30 minute la rece pentru a îndepărta proteinele celulare denaturate de către detergent.

Supernatantul clar se decantează, se amestecă cu un volum egal de alcool etilic 95 %. ADN-ul precipită sub forma unor filamente lungi care se culeg cu o baghetă prin rotirea acesteia în soluție.

ADN-ul se spală cu alcool de 70, 80 și 95 % pentru îndepărtarea sărurilor și urmelor de ARN.

ADN-ul obținut se dizolvă în NaCl 0,15 M și se păstrează la $+4^{\circ}\text{C}$ cu câteva picături de cloroform.

Puritatea preparatului se verifică prin raportul E_{280}/E_{260} care trebuie să aibă valoarea 0,37.

DOZAREA SPECTROFOTOMETRICA A ACIZILOR NUCLEICI

Concentrația în ARN și ADN a preparatelor obținute prin extracțiile descrise anterior se determină spectrofotometric, bazându-ne pe absorbția specifică în UV la 260 nm.

Soluția de acizi nucleici extrași se diluiază convenabil (1/10 - 1/100) în ser fiziologic sau în tamponul indicat pentru determinările ulterioare.

Se citește extincția la 260 nm față de solvan (martor). Concentrația se calculează, raportând extincția la o curbă etalon construită cu produse comerciale având limitele 0 - 200 γ /ml. Se ține seama la calcul de diluția făcută.

DOZAREA BAZELOR AZOTATE PRIN CROMATOGRAFIE PE HIRTIE

Principiu

Se separă cromatografic bazele azotate obținute prin hidroliza acidă a acizilor nucleici.

Reactivi

1. Acid percloric 70 %

2. Sol. KOH 2 N

3. Sol. HCl 0,5 N

4. Amestec alcool izopropilic - acid clorhidric

 alcool izopropilic absolut 130 ml

 acid clorhidric conc. 334 ml

 apă distilată 36 ml

5. Amestec pentru eluție

 Sol A: alcool izopropilic 110 ml

 apă distilată 30 ml

 HCl conc. 12,5 ml

 Sol. B: Butanol 80 ml

 Acid acetic glacial 12 ml

 Apă distilată 30 ml

În momentul întrebuintării se amestecă cele două soluții,

Modul de lucru

1 - 1,5 mg acid nucleic se hidrolizează cu 0,2 ml acid percloric 70 % pe baie de apă la 100°C timp de 100 minute, se diluiază cu aproximativ 4 volume apă distilată și se neutralizează cu KOH 2 N.

Percloratul de potasiu insolubil se îndepărtează prin centrifugare. Supernatantul se evaporă pe baia de apă. Se reia cu 0,025 ml acid clorhidric 0,5 N.

Pentru analiza cromatografică se utilizează din această soluție 0,01 ml pentru fiecare probă.

Proba și martorii pentru cele patru baze (concentrație între 20 - 40 μ g în HCl 0,1 N) se pipetează pe linia de start, la 8 mm de extremitatea hîrtiei de filtru, în sensul migrării indicat de fabrică. Proba de analizat se pune în mijlocul liniei, iar martorii pe părțile laterale.

În general pentru migrare sînt necesare aproximativ 30 ore.

După uscarea cromatogramei, spoturile sînt eluate și se examinează în ultraviolet la 260 nm.

DOZAREA ACTIVITATII ADENOZINDEZAMINAZEI

Principiu

Activitatea adenzindezaminazei care catalizează dezaminarea adenzinei la inozină, se măsoară prin determinarea descreşterii absorbţiei optice la 265 nm.

Reactivi

1. Tampon fosfat 0,05 M pH 7,4

KH_2PO_4	0,68 g
K_2HPO_4	0,87 g
Apă distilată pînă la	100 ml
2. Sol. adenzină 4×10^{-5} M

adenzină	5,34 mg
apă distilată	10 ml
3. Sol. izotonică de KCl

	11,2 g %.
--	-----------
4. Sol. acid percloric 10 %

acid percloric 70 % (D = 1,67)	8,55 ml
apă distilată pînă la	100 ml
5. Omogenat de ţesut 1/10(g/v) în ser fiziologic

Modul de lucru

In două eprubete de centrifugă se pipetează

	P	M
	ml	ml
adenzină	0,1	0,1
tampon fosfat	2,0	2,0

Omogenat	0,1	-
KCl	0,3	0,3

Se introduc eprubetele pentru 30 minute la termostat la 37° C.

Acid percloric	2,5	2,5
----------------	-----	-----

Se lasă în repaus la 0° C timp de 12 - 18 ore și apoi se centrifughează. Supernatantul este utilizat pentru dozarea activității enzimei.

Se citesc excințiile probei și martorului la 265 nm utilizând cuva de quartz cu diametrul de 0,5 cm a spectrofotometrului.

Calcul

$$E_M - E_P = E$$

$$E \times 285 = \mu\text{moli} / \text{g} / \text{h} \text{ adenzină dezaminată}$$

Valori normale

40 - 45 $\mu\text{moli/g/h}$ în ficat de șobolan.

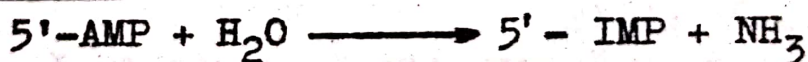
Observații

În loc de omogenat se poate utiliza 0,1 ml hemolizat diluat 1:10.

DOZAREA ACTIVITĂȚII 5'-AMP DEZAMINAZEI

(Metoda Kalckar modificată)

Principiu



Dezaminarea compușilor adeninei este însoțită de o scădere a absorbției în ultraviolet.

La 265 nm extincția molară a 5'-IMP este numai 40 % din cea a 5'-AMP.

Reactivi

1. Sol. AMP 8×10^{-5} M
5,34 mg la 10 ml apă distilată
2. Sol. LiSO_4 0,4 M

LiSO_4	4,397 g
apă distilată	100 ml
3. Tampon fosfat 0,05 M pH 7,4
4. Acid percloric 10 %
5. Omogenat de țesut 1/10 (g/v) în ser fiziologic.

Modul de lucru

In două eprubete de centrifugă se pipetează:

	P	M
	ml	ml
AMP	0,1	0,1
Tampon fosfat	2,0	2,0
Omogenat	0,1	-
LiSO_4	0,3	0,3

Se introduc eprubetele la termostat la 37°C pentru 30 minute, apoi se adaugă:

Acid percloric	2,5	2,5
----------------	-----	-----

Se lasă în repaus la 0°C timp de 12 - 18 ore, după care se centrifughează. Se pipetează apoi în cuva de 0,5 cm a spectrofotometrului supernatant și se determină extincțiile probei și martorului la 265 nm.

Calcul

$$E_M - E_P = E$$

$E \times 285 = \mu\text{moli/g/h } 5' - \text{AMP dezaminat.}$

Valori normale

40 - 48 $\mu\text{moli/g/h}$ în ficat de șobolan.

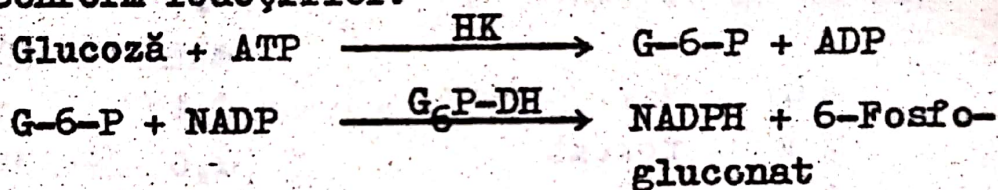
Observații

În loc de omogenat de țesut se poate utiliza 0,1 ml hemolizat diluat 1:10.

DOZAREA ACTIVITĂȚII HEXOKINAZEI

Principiu

Dozarea activității hexokinazei se bazează pe măsurarea creșterii extincției cauzată de formarea NADPH conform reacțiilor:



Reactivi

1. Tampon tris pH 7,4
2. Sol. glucoză 1,8 g/10 ml.
3. Sol. MgCl_2 0,1 M ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,203 g/ml)
4. Sol. ATP 0,058 g/ml
5. Sol. NADP 0,007 g/ml
6. Sol. $\text{G}_6\text{P-DH}$ 0,002 g/ml

Modul de lucru

În cuva de quartz cu diametrul de 0,5 cm a spectrofotometrului se pipetează:

tampon tris pH 7,4	1,67
ATP	0,05
MgCl_2	0,05

glucoză	0,1
G ₆ PDH	0,01
hemolizat	0,08
NADP	0,03

Se agită ușor cu o baghetă de plastic și se citește extincția E_0 la spectrofotometru, iar după cinci minute extincția E_5 .

Calcul

ΔE = variația extincției pe minut

$$\frac{\Delta E \times 2 \times V}{6,22} = \mu\text{Mol glucoză transformată}$$

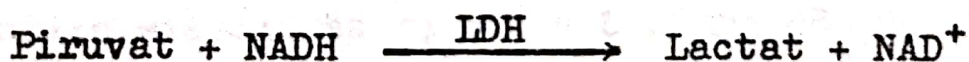
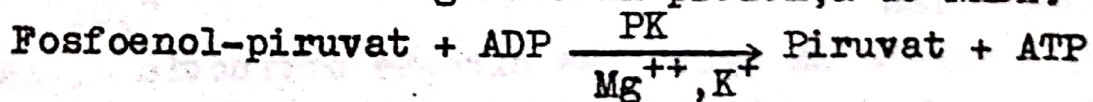
într-un minut de către enzima din 0,08 ml hemolizat.

Activitatea enzimei se exprimă în $\mu\text{Mol/ml celule/minut}$.

DOZAREA ACTIVITATII PIRUVATKINAZEI

Principiu

Piruvatkinaza transformă fosfoenol-piruvatul în prezența ADP și a ionilor de Mg și K în piruvat, care este mai departe transformat în lactat de către lactat dehidrogenază în prezență de NADH.



Scăderea concentrației NADH este stoechiometrică cu cantitatea de fosfoenol-piruvat transfor-

mat și se măsoară prin scăderea extincției la 340 nm.

Reactivi

1. Tampon tris pH 7,4
2. Sol. KCl 2 M(14,9 g KCl %)
3. Sol. $MgSO_4$ 0,5 M(13,9g $MgSO_4$ %)
4. Sol. ADP 0,01 M (51,1 mg ADP/10 ml)
5. Sol. NADH 0,01M (7mg/ml în $NaHCO_3$ 1 %)
6. Sol. LDH (0,02 ml LDH + 0,18 ml $(NH_4)_2SO_4$ 2,4 M)
7. Sol. fosfoenol-piruvat 4×10^{-2} M(100 mg/5 ml)
8. Acid percloric 6 %
9. Sol. KOH 10 N

Modul de procedare

La 2 grame de țesut se adaugă 6,5 ml acid percloric 6 %, se agită bine 5 minute și se centrifughează apoi timp de 5 minute la 3000 t/minut. Supernatantul separat se neutralizează cu KOH 10 N.

În căva de quartz, cu diametrul de 0,5 cm se pipetează:

tampon tris	0,5	ml
KCl	0,075	ml
$MgSO_4$	0,032	ml
ADP	0,05	ml
NADH	0,04	ml
supernatant	1,5 ml	ml
LDH	0,01	ml

Se agită, se citește extincția E_o la 340 nm
fosfoenol-piruvat 0,02 ml

Se agită din nou și se citește extincția
pînă se consumă tot piruvatul format în reacție(ex-

tincția nu mai scade) - E_f

Calcul

$$\Delta E = E_f - E_o$$

$$\frac{\Delta E \times 2 \times V}{6,22} = \mu\text{Mol fosfoenol- piruvat trans-}$$

format de către enzima din 1,5 ml supernatant.

Activitatea se exprimă în $\mu\text{Mol/g/minut}$

DOZAREA SODIULUI SI POTASIULUI IN TESUT

Principiu

Tesutul este distrus cu amestec sulfo-percloric, iar reziduul este reluat cu apă distilată și utilizat pentru dozarea Na și K prin metodele cunoscute.

Reactivi

1. Acid sulfuric concentrat
2. Acid percloric 70 %
3. Acid azotic concentrat
4. Carbonat de litiu
5. Acid acetic glacial
6. Azotit de sodiu 20 %

Modul de lucru

Intr-un balon Kjeldahl prevăzut cu o pîlnie de sticlă se introduc 5 g țesut, se adaugă 5 ml amestec sulfopercloric(acid sulfuric 3,5 ml + acid percloric 6,5 ml). Se încălzește balonul la un bec de gaz, sub o nișă cu tiraj bun, pînă la înegrirea

amestecului. Se adaugă 20 ml acid azotic conc. picătură cu picătură și se procedează ca la tehnica generală de mineralizare.

Distrugerea este terminată după 30 - 45 minute, dar pentru țesuturile bogate în grăsimi timpul de distrugere este mai lung.

Reziduul se reia cu câțiva ml de apă bidistilată fierbinte pentru dezagregarea masei solidificate. Se adaugă puțin HCl pentru dizolvarea fosfaților insolubili. Se aduce la volumul de 10 ml cu apă bidistilată. Această soluție se utilizează pentru dozarea sodiului și potasiului:

a) dozarea sodiului - 2 ml din soluția de mai sus se tratează conform metodei de dozare a Na cu acetat de magneziu și uranil, sau se diluiază la 50 ml cu apă bidistilată și se citește concentrația în Na la flamfotometru.

b) dozarea potasiului - se neutralizează 2 ml din aceeași soluție cu carbonat de litiu. Excesul foarte mic de carbonat de litiu este descompus cu câteva picături de acid acetic glacial, se adaugă 2 ml azotit de Na 20 % și 0,5 ml acid acetic glacial pentru trecerea amoniacului în azot. Se pune 30 minute la baie de apă care fierbe, se răcește și se aduce la un volum de 20 ml cu apă bidistilată (concentrația probelor în K poate varia de la 0,1 - 5 mg).

Din această soluție se ia în lucru 1 ml pentru dozarea potasiului prin metodele curențe.

DOZAREA CALCIULUI IN TESUT

Principiu

Se calcinează țesutul, iar reziduul rezultat se reia cu acid clorhidric și se utilizează pentru dozarea calciului.

Reactivi

1. HCl 5 %
2. Acid acetic 0,5 %

Modul de lucru

Se calcinează 500 mg țesut proaspăt recoltat, iar reziduul se reia cu 2 ml HCl 5 % și se evaporă la sec pe o baie de apă. După răcire se dizolvă reziduul cu 5 ml acid acetic 0,5 % și se trece într-o eprubetă de centrifugă din sticlă neutră. Se clătește creuzetul cu încă 4 ml acid acetic, pentru trecerea cantitativă a reziduului în eprubeta de centrifugă.

Se procedează apoi ca la dozarea calciului în ser.

DOZAREA LITIULUI IN TESUT

Principiu

Reziduul rezultat prin calcinarea țesutului este reluat cu acid clorhidric și utilizat pentru dozarea litilui.

Reactivi

1. HCl 5 %

2. Carbonat de calciu pulbere
3. Alcool etilic 95 %

Modul de lucru

Se calcinează 5 g țesut, iar cenușa rezultată se reia cu 2 ml HCl 5 %. Excesul de acid se îndepărtează prin evaporare pe baie de apă, iar resturile insolubile, prin filtrare.

Filtratul este diluat cu apă bidistilată în proporție 1/5 și neutralizat cu CaCO_3 pulbere la pH 7,6 - 7,8 în prezența albastrului de bromtimol.

Se filtrează, iar filtratul este tratat cu un volum egal de alcool etilic 95 % și lasat în repaus 12 ore pentru precipitarea calciului.

Se evaporă alcoolul pe baie de apă, iar soluția rămasă se diluiază la 50 ml cu apă bidistilată. Concentrația în litiu se citește la flamfotometru sau spectrofotometru la 671 nm.

Observații

Soluția finală se poate utiliza și pentru dozarea cesiului (852 nm) și rubidiului (780 nm).

Conținutul mineral al țesutului muscular (mg %)

K^+	320 - 400	Cl^-	70
Na^+	8	SO_4^{2-}	urme
Ca^{++}	80	HCO_3^-	15
Mg^{++}	21	PO_4^{3-}	7

B I B L I O G R A F I E

1. ABABEI, L. - Colecția de lucrări (1957 - 1973)
2. AMELUNG, D. - Diagnosticul enzimatic al bolilor interne, Ed. Medicală, Buc. (1965)
3. ASTATIANI, B.C. - Biohimicescaia Fotometria, Acad. Nauk, S.S.R., Moscva (1957)
4. BAILEY, J.L. - Techniques in Protein Chemistry, Ed. Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1967)
5. BARKER, S.B., SUMMERSON, W.H. - J.B.C., 138, 535 (1941)
6. BATCU, A., FAIGHELIS, C., SERBAN, F. - Biochimie medicală. Lucrări practice, Vol. I și II, Ed. I.M.F. Iași (1956)
7. BERGMAYER, H.U., BERNT, E., HESS, B. - Methods of Enzymatic Analysis, Ed. H.U. Bergmeyer, Verlag Chemie, G.M.B.H. Weinheim/Bergstr. (1965)
8. BOULANGER, P., POLONOVSKI, J., TAYEU, F., MANDEL, P., BISETRE, G. - Biochimie medicale, Ed. 8-a, Masson et C^{ie}, Fasc. III (1968)
9. BRUGSCH, J. - Lehrbuch der Klinischen Chemie, Ed. VEB Georg Thieme, Leipzig (1970)
10. BÜCHNER, M., GABSCH, H.H. - Moderne Chemische Methoden in der Klinik, Ed. VEB Georg Thieme, Leipzig (1961)
11. DEMEULENAERL, L. - Examenul funcțional hepatobiliar Ed. Medicală, Buc. (1965)

12. DUMITRU, I.F. - Lucrări practice de biochimie, Ed. Didactică și Pedagogică, Buc. (1967)
13. FIESSINGER, N. - Les diagnostics biologiques et fonctionnels, Ed. Librairie Maloine, Paris (1949)
14. FISKE, C.H., SUBBAROW, Y. - The Colorimetric Determination of Phosphorus, J. Biol. Chem., 66, 375 (1925)
15. FLORENCE, G., ENSELME, J. Précis de Chimie Biologique et Médicale, Ed. Librairie Maloine, Paris (1950)
16. GEORGESCU, P., PAUNESCU, P. - Metode biochimice de diagnostic și cercetare, Ed. Medicală, Buc. (1960)
17. GHETIE, V., MICUSAN, V. - Analiza imunochimică, Ed. Academiei, Buc. (1966)
18. GHIMICESCU, G., DUMBRAVA, E. - Lucrări practice. Bazele analizei în biochimie, Ed. I.M.F. Iași (1968)
19. GORDON, A.H., FISCHER, L., CLAUSEN, J. - Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Ed. North Holland Publishing Company (1969)
20. HAIS, J., MACEK, K. - Cromatografia pe hîrtie, Ed. Tehnică, Buc. (1960)
21. HEILMEYER, L., SITTER, A. - Manual de probe funcționale clinice, Traducere în limba română după Ed. Gustav Fische, Jena (1960)

22. HESS, B. - Enzymes in Blood Plasma, Ed. Academic Press, N.Y. (1963)
23. HOMULKA, J. - Chemische Diagnostik im Kindersalter Ed. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1960)
24. IDELSON, L.J. - Narujenje porfirinovovo obmena v Klinike, Ed. Medicina, Leningrad (1968)
25. IDU, U.S., CIMPEANU, S. - Electroforeza tehnică și clinică, Ed. Medicală, Buc. (1957)
26. LANGE, B. - Analyse colorimetrique (1948)
27. LEHNINGER, A.L. - The Mitochondrion, Moskva (1966)
28. LITEANU, C., HOPIRTEAN, E. - Chimie analitică cantitativă, Ed. Did. și Ped., Buc. (1955)
29. LOISELLEUR, J. - Techniques de laboratoires, Ed. Masson, Paris (1954)
30. LUCA, C. - pH-ul și aplicațiile lui, Ed. Tehnică, Buc. (1964)
31. MANTA, I., CIPLEA, A. - Metodele laboratorului clinic, Ed. II, Tipografia Cartea Românească, Cluj (1947)
32. MINCU, J. - Boli de metabolism și nutriție, Ed. Did. și Ped., Buc. (1969)
33. PAUNESCU - PODEANU, A. - Ghid de date biologice și patologice, Ed. Medicală, Buc. (1966)
34. PELLONI - TOMAS, V., IOHAN, F. - Cromatografia în strat subțire, Ed. Tehnică, Buc. (1971)
35. PORTOCALA, R., POPA, L. - Acizii ribonucleici celulari și virali, Ed. Academiei R.S.R., Buc. (1966)

36. POPESCU, M. - Studii și cercetări de inframicrobiologie, 22(5), 459 (1971)
37. PREDTECENSKI, V.K., BOROVSCAIA, V.M., MARGOLINA, I.T. - Metode de laborator clinic, Ed. de Stat, Buc. (1962)
38. RACKER, E. - Methods in Enzymology, Ed. S.P. Colowick, Acad. Press, N.Y. Vol. I (1965)
39. RAPOPORT, S.M., RADERECHT, H.J. - Physiologisch chemisches Praktikum, Ed. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1960)
40. RICHTERICH, R.P. - Clinische Chemie, Ed. Basel (1960)
41. SCHOLLER, R., JAYLE, M.F. - Gas chromatography of hormonal steroids (1967)
42. SCHMIDT, R.M. - Der Liquor cerebro-spinalis, Ed. VEB Volk und Gesundheit, Berlin (1968)
43. SIBI, M. - Colecție de metode de laborator (1947-1963)
44. SORU, E. - Biochimie medicală, Vol. I și II, Ed. Medicală, Buc. (1963)
45. SUSENNIKOVA, V.M., KISELEVA, E.K. - Indrumător pentru prepararea soluțiilor titrate, Ed. Tehnică, (1967)
46. TARLOTIN, J.C. - Microdétermination du glucose dans les liquides biologiques par la méthode à l'orto-toluidine, Ann. Biol. Clin. 1-2, 173, (1966)
47. TANASE, I. - Tehnica cromatografică, Buc. (1967)

48. TANASESCU, G. - Biochimie medicală. Lucrări practice, Ed. Did. și Ped. Buc. (1966)
49. TRANDAFIRESCU, M., FILIP, M. - Indrumar de laborator pentru Chimie Biologică, Ed. I.M.F. Iași (1973)
50. VASILESCU, I. - Tehnologia și aplicațiile industriale ale enzimelor, Ed. Tehnică, Buc. (1963)
51. VASU, S. - Analiza electroforetică a acizilor nucleici în gel de agaroză și poliacrilamidă, Studii și cercetări de inframicrobiologie, 22 (5), 459 (1971)
52. WHISTLER, J.R. - Methods in Carbohydrate Chemistry Ed. Academic Press, N.Y. (1965)
53. YOSHIKAWA, H. - Collected Papers 1953 - 1971, Ed. Yoshikawa (1971)

STAGIU IN LABORATORUL UNITATII SANITARE
biochimie, chimie sanitară și toxicologie

- La sfîrșitul stagiului farmacistii vor fi capabili;
- să execute prepararea de soluții molare și titrate
 - să execute prepararea de indicatori
 - să execute prepararea soluțiilor tampon
 - să cunoască reținile teoretice și practice privind aparatura de spectroscopie, metodele colorimetrice și aparatura respectivă, metodele fotometrice și aparatura respectivă.
 - să execute examenul complet al urinei
 - să execute determinarea glicemiei cu metodele; antroni, ortotoluidinei, Ionescu Matiu, polarimetrică
 - să execute electroforeza pe hîrtie
 - să execute dozarea proteinelor serice totale
 - să execute dozarea transaminazelor GOT și GPT
 - să execute teste de disproteinemie (Tymol, Takata Ara, Sulfat de Zinc)
 - să execute determinarea bilirubinemiei totale, directe și indirecte
 - să execute dozarea ureei în sînge și urină cu metoda urează
 - să execute dozarea acidului uric
 - să execute dozarea colesterolului
 - să execute dozarea lipidelor totale
 - să execute dozarea fierului seric
 - să execute dozarea amilazei serice și urinare
 - să execute dozarea fosfatozelor acide și alcaline
 - să execute dozarea acidității sucului gastric
 - să aplice tehnica recoltării suspensiilor din aer
 - să determine dioxidul de carbon din aer
 - să aplice tehnica recoltării gazelor și vaporilor din aer
 - să determine poluanții din aer cu acțiune sistemică (Pb, F, etc.)
 - să determine poluanții din aer cu acțiune iritantă (SO₂, NO₂, oxidanți, amoniacul, suspensii solide)
 - să determine poluanții din aer cu acțiune asfixiantă

- să determine poluanții din apă cu acțiune cancerigenă, HPA, As.
- să aplice tehnica recoltării probelor de apă pentru analiză
- să determine proprietățile organoleptice ale apei; gust, miros.
- să determine proprietățile fizice ale apei; temperatură, turbiditate, culoare
- să determine pH-ul apei
- să determine reacții titrate a apei; alcalinitate, aciditate
- să determine rezidul apei
- să determine CO_2 din apă
- să determine substanțele indezirabile din apă; clorurile sulfatilor, calciul, magneziul, duritatea, fierul, manganul
- să determine substanțele chimice potențial toxice; F , NO_3 , Pb .
- să determine micropoluanții chimici din apă; detergenți, pesticide, fenoli
- să determine indicatorii chimici de poluare a apei; OD, CBO_5 , NH_3 , NO_2 fosfați, H_2S , CCO .
- să determine clorul rezidual din apă
- să determine clorul activ din substanța clorigenă
- să determine necesarul de clor pentru dezinfecția apei
- să aplice tehnica de recoltare a probelor de produse alimentare, conform legislației
- să determine conținutul în proteine, lipide, glucide, ale alimentelor
- să determine calciul, fosforul și fierul în produsele alimentare
- să determine conținutul în vitamina C
- să execute controlul fizico-chimic al laptelui și derivatelor de lapte (substanță uscată, titru proteic, impurități, aciditatea, grăsimi, calitativ și cantitativ) și controlul pasteurizării.
- să execute controlul fizico-chimic al cărnii și derivatelor de carne; reacția cărinii, pH, identificarea NH_3 , prin reacția Неслер, Eber, identificarea hidrogenului sulfurat
- să determine conținutul în apă a proteinelor și lipidelor
- să execute controlul fizico-chimic al cerealelor și derivatelor cerealiere; determinarea umidității făinei, acidității făinii și făinei și glutenului și a porozității

- 3 -
tății pîinii

- să execute controlul fizico-chimic al băuturilor alcoolice și nealcoolice, determinarea acidității, conținutului de vitamină C, conținutul concentrației alcoolice
 - să execute controlul fizico-chimic al grăsimilor alimentare; determinarea punctului de topire (indice de refracție, aciditate, indici de rîncezire) *grr*
 - să execute controlul conservelor alimentare; aciditate, prezența impurităților, examen organoleptic, etanșeitatea ambalajelor, conținut în vitamină C.
 - să determine prezența aditivelor alimentare uzuali; nitriți în produsele derivate de carne, SO_2 în conserve de fructe, acid sorbic în conserve și băuturi nealcoolice
 - să identifice prezența coloranților alimentari neadmiși în alimente
 - să identifice prezența contaminanților alimentari sau a fraudelor principale ca; metale sau metaloizi toxici Pb, Cu, Sr, As pesticide organoclorurate DDT, HCH, organofosforate (parationi)
 - să identifice conservanții nepermisi (acid salicilic, fenol, bicarbonat de sodiu)
 - să identifice prezența aflatoxinelor în produse mucegăite
-
-.-.-.-.-